

# TERMÉSZET IHLETTE HISZTIDINGAZDAG LIGANDUMOK KÖLCSÖNHATÁSA CINK(II)-, RÉZ(II)- ÉS NIKKEL(II)IONOKKAL

*Doktori (Ph.D.) értekezés*

Kolozsi András

Témavezetők:

Dr. Gajda Tamás

Dr. Gyurcsik Béla



Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Kémia Doktori Iskola  
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

**SZEGED**  
**2009**

# Tartalom

<b>1. Bevezetés .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Célkitűzés .....</b>	<b>3</b>
<b>3. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>6</b>
3.1. A vizsgált komplexekben előforduló fémionok biológiai szerepének rövid összefoglalása.....	6
3.2. A peptidek komplexképző sajátosságai .....	9
3.2.1. A hisztidinben gazdag peptidek réz(II)komplexei .....	10
3.2.1.1 A kettő hisztidint tartalmazó peptidek réz(II)komplexei .....	10
3.2.1.2 A három hisztidint tartalmazó peptidek réz(II)komplexei .....	13
3.2.1.3 A háromnál több hisztidint tartalmazó peptidek réz(II)komplexei .....	16
3.2.2. A hisztidinben gazdag peptidek cink(II)komplexei .....	17
3.2.3. A hisztidintartalmú peptidek nikkel(II)komplexei.....	19
3.2.4. Az elágazó láncú peptidek .....	20
3.3. A hisztidingazdag glikoproteinekről .....	22
3.4. Az endostatin és az angiogenesis .....	24
3.5. A nikkel tartalmú szuperoxid-dizmutázokról.....	26
<b>4. A vizsgált ligandumok szerkezete .....</b>	<b>30</b>
<b>5. Kísérleti és vizsgálati módszerek .....</b>	<b>32</b>
5.1. A ligandumok előállítása, a szilárdfázisú peptid szintézis .....	32
5.2. Folyadékkromatográfia (HPLC) .....	35
5.3. Tömegspektrometria (ESI-MS).....	36
5.4. A pH-potenciometria.....	36
5.5. UV-látható spektrofotometria .....	38
5.6. CD-spektroszkópia.....	40
5.7. ESR-spektroszkópia .....	41
5.8. NMR-spektroszkópia .....	43
5.9. Szuperoxid-dizmutáz aktivitás mérése.....	46
5.10. Pirokatechin-oxidáz aktivitás mérése.....	47
5.11. DNS hidrolízisének vizsgálata .....	48
<b>6. Kísérleti eredmények és értékelésük .....</b>	<b>50</b>
6.1. A hisztidingazdag glikoprotein hisztidingazdag tartományából származtatott peptidek fémkötő tulajdonságainak vizsgálata.....	50
6.1.1. Az Ac-HHPHG-NH <sub>2</sub> (HP1) és Ac-HHPHGHHHPHG-NH <sub>2</sub> (HP2) peptidek protonálódási viszonyai.....	50
6.1.2. A HP1 és HP2 peptidek kölcsönhatása cink(II)ionokkal .....	50
6.1.3. A HP1 és a HP2 peptidek kölcsönhatása réz(II)ionokkal .....	56
6.2. Az endostatin N-terminális fragmens fémkötő tulajdonságainak vizsgálata .....	67
6.2.1. A HSHRDFQPVLHL-NH <sub>2</sub> (L) peptid protonálódási viszonyai .....	67
6.2.2. A HSHRDFQPVLHL-NH <sub>2</sub> (L) peptid kölcsönhatása cink(II)ionokkal .....	67
6.2.3. A HSHRDFQPVLHL-NH <sub>2</sub> (L) peptid kölcsönhatása réz(II)ionokkal .....	71
6.3. A Ni-SOD enzimek szerkezeti és működési modellezése.....	78
6.3.1. A HCDLPCH-NH <sub>2</sub> peptid protonálódási viszonyai.....	78
6.3.2. A HCDLPCH-NH <sub>2</sub> peptid kölcsönhatása nikkel(II)ionokkal .....	78

6.3.3.	A nikkel(II)–HCDLPCG-NH <sub>2</sub> rendszer szuperoxid-dizmutáz aktivitása .....	84
6.4.	Egy elágazó láncú peptid fémkötő tulajdonságainak vizsgálata .....	86
6.4.1.	A (His) <sub>4</sub> -(Lys) <sub>2</sub> -Lys-CONH <sub>2</sub> peptid protonálódási viszonyai .....	86
6.4.2.	A (His) <sub>4</sub> -(Lys) <sub>2</sub> -Lys-CONH <sub>2</sub> peptid kölcsönhatása réz(II)ionokkal .....	88
6.4.3.	A (His) <sub>4</sub> -(Lys) <sub>2</sub> -Lys-CONH <sub>2</sub> peptid kölcsönhatása cink(II)ionokkal .....	93
6.4.4.	Enzimaktivitás vizsgálatok .....	95
6.4.4.1	DNS hidrolízisének vizsgálata .....	95
6.4.4.2	A 3,5-di-tercbutil-pirotechin (H <sub>2</sub> dtbc) oxidációja .....	96
<b>7.</b>	<b>Összefoglalás .....</b>	<b>98</b>
<b>8.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>101</b>
<b>9.</b>	<b>Irodalom .....</b>	<b>107</b>
<b>10.</b>	<b>A szerző közleményeinek listája.....</b>	<b>113</b>
<b>11.</b>	<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>114</b>

## 1. Bevezetés

Jelen értekezés a bioszervetlen kémia tárgykörében született, mely olyan határtudomány, ami választ keres arra, hogy a szervetlen elemek milyen hatást fejtenek ki a biomolekulák egészére, milyen módon befolyásolják, illetve alakítják ki azok funkcióit. Többségében a fémionok oldaláról vizsgálja és egészíti ki a biológiai és biokémiai szemléletet, hiszen az élőlények számára sok fémion létfontosságú. Az élő szervezetben a fémionok és vegyületeik számos folyamatban vesznek részt, szabályozó szerepet játszanak például a sejtek közötti gyors információáramlásban és a metabolikus folyamatokban. Szerkezetstabilizáló hatásuk révén segítenek kialakítani a fehérjék térbeli elrendeződését, részt vesznek az elektronszállításban, redoxirendszerek alkotói. Az oxigén szállításában és tárolásában, a molekuláris nitrogén, hidrogén, metán, szén-dioxid megkötésében, aktiválásában és átalakításában is szerepet játszanak különböző átmenetifémionok. Mai ismereteink szerint a biológiai folyamatokat katalizáló enzimek kb. 30%-a tartalmaz fémion(oka)t. Az átmenetifémek szinte kizárólag biomolekulához, leggyakrabban fehérjékhez kötődve fejtik ki hatásukat. Hatásmechanizmusuk felderítése nem képzelhető el a fehérjékben/enzimekben betöltött szerepük ismerete nélkül. Nem véletlen tehát, hogy napjaink bioszervetlen kémiájának két meghatározó kutatási iránya a fémtartalmú fehérjék/metalloenzimek működésének mind teljesebb megismerése, illetve a gyakorlati felhasználást lehetővé tevő mesterséges fehérjék/enzimek kifejlesztése.

Az ilyen irányú vizsgálatok két, egymást kiegészítő típusra oszlanak: a natív fehérjék/enzimek és azok kisméretű modellkomplexeinek tanulmányozására. Mindkét megközelítésnek megvannak az előnyei és a hátrányai. A makromolekulák vizsgálata nehézkes, a rendszer bonyolultsága miatt sokszor csak nehezen értelmezhető, de közvetlen, mással nem pótolható információkat szolgáltat. Másrészt, még a legjobb modellkomplexek is csak egy torzított képet adnak a modellezni kívánt fémkötő helyről. Viszont a fehérjéknél jóval egyszerűbbek, így könnyebben kezelhetők, egyszerűbben vizsgálhatók. Általuk lehetővé válik egy-egy rész-folyamat vagy szerkezeti motívum szerepének, sajátosságainak tanulmányozása is, ami a natív rendszerek esetében sokszor lehetetlen. Végül, hatékony funkcionális modellrendszerek segítségével lehetővé válhat a gyakorlatban is alkalmazható, terápiás célt szolgáló fehérjék, valamint bioutánzó katalizátorok/mesterséges enzimek kifejlesztése.

Az eddigi ismeretek azt mutatják, hogy az aminosavak között a hisztidin és a cisztein oldalláncai alakítanak ki legerősebb kölcsönhatást a legtöbb átmenetifém-ionnal. Ebből adódóan a fehérjék fémkötő helyeinek nagy részét ezek az aminosavak szolgáltatják. Nagyszámú fehérje fémkötő helye, illetve metalloenzimek aktív központja tartalmaz egynél több

hisztidint. Tanulmányozásukhoz alkalmas módszer lehet a kismolekulájú modellezés, mely rövidláncú oligopeptidek fémkomplexeinek vizsgálatát jelenti. Az elmúlt évtizedekben igen sok hisztidint tartalmazó peptid fémkomplexét tanulmányozták. Ezek közül azonban csak kevés tekinthető a fémion–fehérje kölcsönhatás valós modelljének, hiszen elvétve vizsgáltak több, 3-4 hisztidint is tartalmazó peptidet. Ezzel van összefüggésben az a tény, hogy a korábban vizsgált cinktartalmú modellrendszerek szinte mindegyikénél csapadék képződik, ill. a réz(II)–peptid rendszerek döntő többségénél amidkoordinált részecskék dominálnak a fiziológias pH-tartományban. Ezáltal megszűnik mind a szerkezeti, mind a funkcionális analógia a peptidek és a modellezni kívánt fehérjék között. Valószínűleg emiatt sem vizsgálták egészen a legutóbbi időkig a metallopeptideket hidrolitikus és oxidatív enzimek funkcionális modelljeként. A modellrendszerek kifejlesztésének további problémája, hogy az enzimek aktív központjának környezete sok esetben rögzített szerkezettel rendelkezik, ráadásul a fémionhoz kötődő donorcsoportok sokszor a szekvenciában egymástól igen távol helyezkednek el. Mindezek komoly nehézségeket támasztanak a (kis) peptidekkel való modellezés terén, melyek leküzdésére jelen értekezésben két stratégiát is alkalmazunk.

## 2. Célkitűzés

A biokémiai kutatások eredményeként az elmúlt években nagyszámú fehérje/enzim esetén azonosítottak olyan viszonylag rövid, rögzített szerkezettel nem rendelkező, hisztidinben gazdag alegységeket, melyek a biomolekula egyéb részeitől jórészt függetlenül működve nagy jelentőséggel bírnak az adott funkció ellátása szempontjából. E szekvenciák a legtöbb esetben erős fémkötő helyek, melyekről igazolták, hogy a fémion koordinációja meghatározza/kiegészíti a fémtartalmú fehérje/enzim funkcióját. Fémionokkal való kölcsönhatásuk megismerése alapvető a hatásmechanizmus feltárása szempontjából.

A négy fő fejezetből felépülő disszertációban nagyrészt ilyen, viszonylag rövid, hisztidinben gazdag szekvenciák – többek között a terápiás felhasználás lehetőségét is magukban hordozó peptidfragmensek – fémkötő sajátosságainak vizsgálata szerepel.

Az első fő fejezetben az **Ac-HHPHG-NH<sub>2</sub>** és **Ac-HHPHGHHPHG-NH<sub>2</sub>** penta- és decapeptidek cink(II)- és réz(II)komplexeivel a hisztidingazdag glikoprotein (HRG) fémkötő helyeinek szerkezeti modellezését tűztük ki célul. A HRG egy az emberben is jelentős koncentrációban előforduló plazmafehérje, melynek hisztidinben gazdag régiója (HRR) egy tandem módon ismétlődő szekvenciát tartalmaz. (Ilyen a humán HRG-ben 12-szer egymás után ismétlődő (G)HHPH(G) fragmens). A kutatási eredmények arra utalnak, hogy HRR számos biológiai folyamat szabályzásában vesz részt, melyekben alapvető szerepet kap ezen alegység különböző fémionokkal (például Zn(II), Cu(II)) kialakított erős kölcsönhatása.

A munka második részében a rákellenes hatású, cinktartalmú endostatin fehérje N-terminális szekvenciájával megegyező **HSHRDFQPVLHL-NH<sub>2</sub>** peptid cink(II)- és réz(II)komplexeit tanulmányoztuk. Legújabb kimutatták, hogy a 25 tagú N-terminális fragmens és a teljes fehérje tumorelles aktivitása megegyezik. A cink(II)ion jelenléte mindkét esetben szükséges a tumorelles hatás kifejtéséhez. Az általunk előállított és vizsgált tizenkét tagú peptid nagy valószínűséggel tartalmazza azokat az oldalláncbeli donorcsoportokat, melyek koordinálódhatnak a fémionhoz a 25 tagú fragmensben. Érdekes, hogy az endostatin a szabad N-terminális aminocsoport és a harmadik helyen található hisztidin révén úgynevezett ATCUN motívum is, mely igen hatékony réz(II)kötő hely számos fehérjében.

A HRG és endostatin jelentősége tumorelles sajátágaikban rejlik, melyet az érképződés (angiogenesis) szabályozásában résztvevő makromolekulákhoz való kötődés révén fejtenek ki, fémionok (például Zn(II)) jelenlétében. Hatásuk mechanizmusa azonban máig nem ismert. E tekintetben érdekes az a nemrégiben közölt megfigyelés is, hogy az angiogenesishez lokálisan magas réz(II)koncentráció szükséges, s ez utóbbi csökkentése révén lehetséges a

rákos sejtek növekedésének gátlása. E hisztidingazdag peptidek ilyen célra alkalmasak lehetnek.

Bár csak egyetlen hisztidint tartalmaz, tematikusan jól illeszkedik kutatásainkhoz a közelmúltban felfedezett, nikkell(II)tartalmú szuperoxid-dizmutáz család N-terminális fragszének fémkötő sajátságait feltáró törekvésünk, mely értekezés harmadik pillérét képezi. Az enzimben a katalitikus hatásért felelős nikkell mind oxidált ( $\text{Ni}^{\text{III}}$ ), mind redukált ( $\text{Ni}^{\text{II}}$ ) formában kizárólag a His1, Cys2 és Cys6 aminosavakhoz kötődik. A **HCDLPCG-NH<sub>2</sub>** heptapeptid kiváló lehetőséget teremt a nikkellkötő hely valószínű modellezésére. E metallopeptid SOD-aktivitásának a már jól ismert Cu,Zn-SOD-dal, ill. a Mn/Fe-SOD-dal való összehasonlítása pedig lehetőséget teremt a szuperoxid dizmutálására vonatkozó eltérő stratégia feltárára, melynek segítségével például nagyhatékonyságú antioxidánsok fejleszthetők ki a jövőben.

A fentiekben vizsgált peptidfragszének viszonylagos rövidsége ellenére a fémion(ok) megkötésében a fehérje egyéb részei nem játszanak szerepet, a fémionkötő helyeket kialakító aminosavak egymás közvetlen szomszédságában helyezkednek el. A természet által „kifejlesztett” fémkötő helyek ráadásul a nagyszámú hisztidin (ill. a SOD-modell esetén cisztein) oldalláncok miatt várhatóan a metalloproteinek aktív centrumához hasonló környezetet alakítanak ki. Az endostatin és a Ni-SOD további közös sajátsága, hogy a fehérjében nem rendelkeznek szigorúan rögzített szerkezettel, hiszen N-terminális fragszensekről van szó. A HRG peptideknél a szerkezeti analógiát úgy növeltük, hogy védőcsoportok alkalmazásával meggátoltuk mindkét terminális csoport fémion-koordinációját. Ezek alapján kiküszöbölhető a rövidláncú peptidek modellként történő alkalmazásának egyik komoly, gyakran emlegetett hátránya, hogy a makromolekula térbeli szerkezetéből, konformációjából származó hatások nem érvényesülnek a kismolekulák vizsgálatakor. Az általunk kiválasztott, természet ihlette fragszének önmagukban is alkalmasak lehetnek a fémionok stabilis, kizárólag az oldalláncok általi megkötésére, s ennek következményeként az adott funkció ellátására.

A fémtartalmú fehérjék/metalloenzimek működésének mind teljesebb megismerése mellett a bioszervetlen kémia másik meghatározó kutatási iránya a gyakorlati felhasználást lehetővé tevő mesterséges fehérjék/enzimek kifejlesztése. A metallohidrolázok, különösen a metallonukleázok funkcionális modellezése mind nagyobb figyelmet kapott az utóbbi években. A különböző szerves vegyületek molekuláris oxigénnel enyhe körülmények között lejátszódó reakciója (oxidációja) szintén nagy gyakorlati jelentőséggel bír mind gazdaságossági, mind környezetvédelmi szempontból. E két látszólag egymással ellentétben lévő funkció közötti kapcsolatot a cinktartalmú hidrolázok, valamint a 2-es és 3-as típusú réztartalmú, oxida-

tív funkcióval rendelkező enzimek aktív centrumának hasonlósága teremti meg. Mindkét típusú metalloenzimre jellemző a fémion körül kialakuló  $\{3N_{im}, H_2O\}$  koordinációs szféra.

Az irodalomból mind a metallohidrolázoknak, mind a réztartalmú oxidázoknak számos funkcionális modellvegyülete ismert. Ezek szinte kivétel nélkül szintetikus ligandumok fémkomplexei. Az utóbbi időig fémion-peptid rendszereket ilyen célból szinte egyáltalán nem vizsgáltak, ugyanis a réz(II)–peptid rendszerek döntő többségénél amidkoordinált részecskék domináltak a fiziológias pH-tartományban. Ezáltal megszűnt mind a szerkezeti, mind a funkcionális analógia a peptidek és a modellezni kívánt fehérjék között. Az amidkoordináció ugyanis jelentősen csökkenti a fémion Lewis-sav jellegét, illetve stabilizálja a réz +2-es oxidációs állapotát, ami a katalitikus hatás drasztikus csökkenésével jár mindkét reakciótípus esetén. Ugyanakkor nagyszámú hisztidinpeptid fémkomplex vizsgálata rámutatott arra, hogy a ligandum koordinációs módja nagymértékben függ a hisztidin alegység(ek) számától, a peptidszekvenciában betöltött helyétől, illetve a környező donorcsoportok minőségétől. Kutatócsoportunkban alkalmasan megválasztott peptidszekvenciával lehetőséget teremtettünk az amidnitrogén koordinációjának megakadályozására a semleges pH körül, s így a metalloenzimek szerkezeti és funkcionális modellezésére.

E stratégia folytatásaként értelmezhető dolgozatomban negyedik fő fejezete, melyben egy új típusú ligandum koordinációs kémiai viselkedését mutatjuk be cink(II)- és réz(II)ionok jelenlétében. Az eddigi tapasztalatokat figyelembe véve megterveztük a **(His)<sub>4</sub>-(Lys)<sub>2</sub>-Lys-CONH<sub>2</sub>** hét aminosavból – 3 lizinből és 4 hisztidinből – álló elágazó láncú peptidet. A C-terminális lizin  $\alpha$  és  $\epsilon$  aminocsoportjához kapcsolt két lizin aminocsoportjaival négy hisztidin hoz létre peptidkötést. Így nagy kötőhelysűrűséget tudunk biztosítani a fémion(ok) körül, hiszen az elágazó láncú peptid ágai jóval flexibilisebbek, mint az egyenesláncú peptidek. A ligandum nyolc elsődleges nitrogéntartalmú kötőhellyel rendelkezik. Egy ilyen vegyület várhatóan képez olyan kétmagvú fémkomplexet, amely hatékony nukleáz és/vagy oxidáz enzimmodellként viselkedik.



### 3. Irodalmi áttekintés

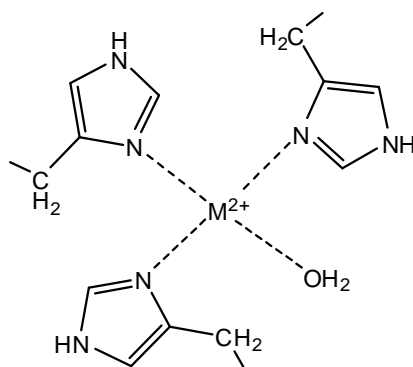
#### 3.1. A vizsgált komplexekben előforduló fémionok biológiai szerepének rövid összefoglalása

Munkánk során különböző ligandumok cink(II)-, réz(II)- és nikkel(II)komplexeit vizsgáltuk. Mindhárom fémion egyaránt létfontosságú az élő szervezetek számára. Közülük a cink található meg legnagyobb mennyiségben az emberben (kb. 2,3 g / 70 kg)  $\text{Zn}^{\text{II}}$  formában, főként fehérjékhez kötve, mert stabilis komplexet képez oxigén-, nitrogén- és kéndonorokkal. A ciszteinben gazdag tionein fehérjék affinitása pl. olyan nagy a cinkcsoport elemeihez, hogy méregtelenítő, ill. cinkraktározó szerepük van. A  $\text{Zn}^{2+} d^{10}$  lezárt külső elektronszerkezete miatt redoxireakciókban nem vesz részt, metalloenzimekben előfordulva leginkább szerkezetalakító, és Lewis-sav jellegéből fakadva hidrolitikus feladatot lát el. Szerkezetalakító hatása érvényesül pl. egyes szuperoxid-dizmutáz enzimekben, az inzulin tárolásában és mobilizációjában, valamint a „cinkujj” fehérjék révén a DNS transzkripciójának szabályozásában. Feltételezések szerint a számos biológiai funkcióval bíró hisztidingazdag glikoprotein sejtfelülethez való kötődéséhez és a rákellenes endostatin fehérje hatásának kifejtéséhez is elengedhetetlen a cink moduláló szerepe. A cinktartalmú metalloenzimek jelentős része a hidrolázok közé tartozik. Ilyen típusú enzim a teljesség igénye nélkül a szénsav-anhidráz, a karboxi-peptidáz, a termolizin, az adamalizin II, az alkalikus foszfatáz, a  $\beta$ -laktamáz, a bíborsav foszfatázok, mátrix metalloproteinek. Ezen enzimek aktív centruma igen hasonló, a cink(II)ion körül a  $\{3\text{N}_{\text{im}}, \text{H}_2\text{O}\}$  vagy  $\{2\text{N}_{\text{im}}, \text{H}_2\text{O}, \text{COO}^-\}$  koordinációs környezet valósul meg. A szintén a hidrolitikus enzimek közé tartozó foszfodiészterázok legjelentősebb csoportját az úgynevezett nukleázok alkotják, melyek az RNS, ill. a DNS lebontásában, a replikáció közbeni másolási hibák javításában, valamint pl. a szervezetbe került idegen vírusok elleni védekezésben játszanak szerepet. A legismertebb cinktartalmú nukleázok a HNH endonukleázok családjának tagjai, melyekben a fémiont tetraéderes környezetben három imidazolgyűrű és egy vízmolekula veszi körül (3.1.1. ábra). A hidrolízis során a cink polarizálja a felbontandó kötést (elektrosztatikusan aktiválja a szubsztrátot), generálja a nukleofil reaktánst (legtöbb esetben a ligandumként kötött víz  $\text{pK}_\text{s}$  értékét oly mértékben lecsökkenti, hogy az hidroxidionná alakul), továbbá stabilizálja a foszforán intermediert és a távozó csoportot.

A réz – a vas és a cink után – a harmadik leggyakrabban előforduló (~0,11 g), létfontosságú átmenetifém. A cinkhez hasonlóan fiziológiás körülmények között ionos formában, azonban a telítetlen  $d$  alhéj miatt különböző – általában  $\text{Cu}^{\text{I}}$  és  $\text{Cu}^{\text{II}}$  – oxidációs állapotokban fordul elő. A növény- és állatvilágban igen sok élettani folyamatban központi szerepet játszik.

Redoxireakciói révén számos biológiai oxidációs funkciót lát el: oxigenáz- és oxidázaktivitás, elektronszállítás, szuperoxid-dizmutálás, nitritredukció. A réz erős komplexképző sajátossága miatt az emberi szervezetben többnyire fehérjékhez kötött formában fordul elő. A réz(I)ion vizes közegben instabil, réztartalmú fehérjékben viszont az apoláris környezet fokozza a réz(I)–fehérjekomplex stabilitását. Mindkét oxidációs állapot stabilitását jelentősen befolyásolja a ligandum minősége. A rézionoknak nagy az affinitása a N és S donoratomokhoz, így a réztartalmú enzimek esetében a hisztidin aminosav imidazolgyűrűjének nitrogénatomja(i) a legfontosabb fémkötő helyek, mind a  $\text{Cu}^{\text{I}}$ , mind a  $\text{Cu}^{\text{II}}$  oxidációs állapotok esetén. A cisztein tiol- és esetenként a metionin tioétercsoportjának S donoratomjai is szerepet játszhatnak a koordinációban.

Szerkezeti és spektroszkópai adatok alapján a réz-fehérjéket korábban három, napjainkban leginkább négy csoportba sorolják. Az értekezés szempontjából a *2-es típusú*, úgynevezett „nem kék réz” fehérjékkel, illetve a *3-as típusú*, kétmagvú réz központot tartalmazó fehérjékkel érdemes bővebben foglalkozni. A *2-es típusú* rézproteinekben alapvetően négyzetes piramis koordináció valósul meg. Ebbe a típusba tartoznak az *oxidáz* enzimek közül az aminoszoxidáz és a lizinszoxidáz, valamint az *oxigenáz* enzimek közül a dopamin- $\beta$ -monooxigenáz és a kvercetin-2,3-dioxigenáz. Ide sorolhatók a szuperoxid-dizmutáz enzimek is. A fenti metalloenzimek aktív központjának közös jellemzője a három imidazol-nitrogén koordinációja, amint az a 3.1.1. ábrán látható. A *d-d* átmeneteknek megfelelően kis moláris abszorpcióssal ( $\epsilon < 1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) és jellemző ESR-spektrummal rendelkeznek.



**3.1.1. ábra:** A hidrolitikus tulajdonságú HNH-endonukleázok ( $\text{M}=\text{Zn}$ ) és az oxidatív funkciót ellátó 2-es típusú rézfehérjék ( $\text{M}=\text{Cu}$ ) aktív centrumának sematikus ábrája.

A 3-as típusú rézfehérjék kétmagvú aktív központtal rendelkeznek, redukált formában a két réz(I)ion egymástól kb. 360 pm távolságra helyezkedik el. Oxidált formájukban is ESR-csendesek az antiferromágneses kölcsönhatásnak köszönhetően. Főként az O<sub>2</sub> szállításában és aktiválásában vesznek részt (hemocianin), de ide tartozik a monooxygenázok közül a tirozináz enzim, az oxidázok közül pedig a citokróm-oxidáz és pirokatechin oxidáz. A tirozináz a monofenolok difenolokká történő átalakulását, míg a pirokatechin oxidáz a különböző *orto*-difenolok kételektronos oxidációját katalizálja megfelelő *orto*-kinonná, miközben a molekuláris oxigén vízzé alakul. A 2-es típusú fehérjékhez hasonlóan a rézionokhoz itt is hisztidil-oldalláncok kapcsolódnak.

A nikkellétfontossága ember és gerinces állatok számára nem egyértelműen bizonyított, jóval kisebb mennyiségben (~ 0,01 g) fordul elő bennük, mint az előző két fémion. (Napjainkig mindössze kilenc nikkeltartalmú enzim ismeretes.) Biológiai rendszerekben való felfedezése sokáig váratott magára, mert kimutatása nehéz, ugyanis bioligandumok jelenlétében nincs, vagy csak kis intenzitású spektruma van. Annak ellenére, hogy vizes oldatban a Ni<sup>II</sup>-forma stabilis, enzimekben változatos oxidációs állapotban fordul elő (Ni<sup>I</sup>, Ni<sup>II</sup>, Ni<sup>III</sup>). A kis ligandumterű donorokkal kialakított oktaéderes geometriájú, nagyspinszámú Ni<sup>II</sup> komplexek általában halványzöld színűek, a két vagy három deprotonálódott peptid-nitrogént tartalmazó síknégyzetes, diamágneses komplexek intenzív sárga színű oldatok. A nikkelt először a karbamid hidrolízisét katalizáló növényi ureáz enzimekből izolálták. Aktív centrumukban két nikkell(II)iont tartalmaznak, melyekhez két-két imidazolgyűrű és egy-egy vízmolekula kötődik. A fémionokat egy aminocsoportján karbamilált lizin köti össze hídként, a Ni<sub>2</sub> koordinációs szféráját egy Asp karboxilát egészíti ki. Nikkelliont tartalmaznak a bakteriális nikkell-vas hidrogenázok, a szén-monoxid-dehidrogenáz (acetyl-coenzim A-szintáz), a metil-coenzim M redukáz. 1996 óta ismertek aktív központjukban egyetlen nikkelliont tartalmazó szuperoxid-dizmutáz enzimek, melyek semmilyen homológiát nem mutatnak a fejlettebb előlények SOD-jaival. A Ni-SOD enzimekkel a későbbiekben külön fejezetben részletesen foglalkozom.

### 3.2. A peptidek komplexképző sajátosságai

A fehérjékhez a fémionok kevés kivételtől eltekintve (albuminok, prion protein, Ni-SOD), az oldalláncokban található donorcsoportokon keresztül koordinálódnak. Ismereteink szerint a hisztidin és cisztein aminosavak oldalláncai alakítanak ki legerősebb kölcsönhatást a legtöbb átmenetifém-ionnal, így a fehérjék fémkötő helyeinek nagy részét ezek az aminosavak szolgáltatják. Fontos szerepe van továbbá az aszparaginsav  $\beta$ - és glutaminsav  $\gamma$ -karboxilcsoport koordinációjának, de az aszparagin és glutamin  $\beta$ - illetve  $\gamma$ -karboxamidcsoport, a szerin hidroxilcsoport, a tirozin fenolos hidroxilcsoport, a lizin  $\epsilon$ -aminocsoport és a metionin tioétercsoport kötődésére is találunk példát a természetben.

A hisztidin oldalláncának imidazolgyűrűjében két N atom található (N(1) vagy  $\epsilon$  és N(3) vagy  $\delta$ ), melyek közül kelát koordináció esetén általában az N(1) „pirrol-típusú” nitrogén koordinálódik a fémionhoz, mert ezáltal kisebb tagszámú, nagyobb stabilitású kelátgyűrű képződik. A cisztein deprotonálódott tiolcsoportja többnyire szoft jellegű fémionokhoz kötődik. Oxidációja során diszulfid-hidak alakulnak ki, melyeknek nagy jelentősége van a fehérjék térbeli szerkezetének kialakításában/stabilizálásában.

A hisztidin tartalmú fémkötő helyek tanulmányozásához elfogadott és régóta alkalmazott módszer a rövidláncú oligopeptidek fémkomplexeinek vizsgálata. A legnagyobb kihívást a modellkomplexek harmadlagos szerkezetének hiányából fakadó, már fiziológias pH-n bekövetkező amidkoordináció leküzdése jelenti réz(II)- és nikkel(II)komplexeikben. Cink(II)komplexeikben az amidkoordináció nem jellemző, itt a semleges és lúgos pH-n az oldatban tartás a legfontosabb cél. Alkalmasan megválasztott peptidszekvenciával lehetőség nyílik arra, hogy fiziológias körülmények között a modellekben a természetben előforduló, oldalláncokon keresztül történő kötésmód valósuljon meg. Ez korántsem könnyű feladat, de az utóbbi években a több hisztidint tartalmazó peptidekkel egyre biztatóbb eredményeket értek el. A szekvenciában egymáshoz közel elhelyezkedő hisztidinalegységek esetében ugyanis kézenfekvő az oldalláncbéli imidazolcsoportokon keresztüli fémion-koordináció. Az amidnitrogén koordináció elkerülésének másik módja a prolin beépítése a szekvenciába. A prolin gyűrűs oldalláncot, szekunder amin tartalmazó aminosav. Láncközi helyzetbe való beépítése „töréspontot” eredményez, mivel a peptidkötés nem tartalmaz hidrogént. A fémionra cserélhető amidprotonok sora megtörik a peptidláncban, és a csatolt 5 vagy 6 tagú kelátgyűrűk kialakulása nem valósulhat meg egymást követő amidnitrogének deprotonálódása révén. Ezen kívül a prolin a peptidlánc konformációjában is változást okoz, s kedvezményezetté válik a makrokelátok kialakulása.

A peptidkomplexek kezdeti tanulmányozásakor nem törekedtek a biomolekulákkal való maximális analógia megvalósítására. Így a vizsgált peptidek szabad N-terminális aminocsoportot tartalmaznak, ami a legtöbb esetben fontos szerepet játszik a fémionok megkötésében. A láncközi kötőhelyek valóságosabb modelljei a mindkét végükön védett peptidek fémkomplexei. Értekezésem szempontjából mind a szabad, mind a védett formák egyaránt jelentősek, ugyanis az általunk vizsgált fragmensek egy része N-terminális vég, ahol az aminocsoport is szerepet játszik a makromolekula fémkötő sajátságainak kialakításában.

### 3.2.1. A hisztidinben gazdag peptidek réz(II)komplexei

Az egy hisztidint tartalmazó peptidek oldategyensúlyi viselkedését összefoglaló munkákból kitűnik, hogy a hisztidin helye az aminosav-szekvenciában alapvetően meghatározza a különböző körülmények között képződő komplexek összetételét és szerkezetét [1-4]. Az utóbbi időkben született nagyszámú publikáció alapján a kettő vagy kettőnél több hisztidint tartalmazó peptidek esetében sincs ez másként.

A hisztidingazdag peptidek vizsgálata rávilágított arra, hogy általános jelenség az enyhén savas, semleges oldatokban az oldalláncokon keresztüli makrokelátok képződése. A várakozásoknak megfelelően a hisztidin oldalláncok számának növekedése a peptidben a makrokelát termodinamikai stabilitásának növekedését eredményezi. Sőt a hisztidin alegységek egymáshoz viszonyított helyzete is fontos tényező a stabilitást illetően. Például az egymást felváltva követő hisztidineket tartalmazó HXH(YH)-szekvencia réz(II)kötő képessége a legnagyobb. A szomszédos elhelyezkedésű és az egymástól kettő vagy annál több aminosavval elválasztott hisztidinekkel rendelkező peptidek réz(II)komplexei kisebb stabilitással bírnak. Az egyéb koordinálódó donorcsoportok (pl. karboxilát, tiolát) jelenléte tovább bonyolítja e peptidek komplexképző sajátságait, melyről mélyebb betekintést nyújt a következő összefoglalás.

#### 3.2.1.1 A kettő hisztidint tartalmazó peptidek réz(II)komplexei

##### 3.2.1.1.a A –HH– szekvenciát tartalmazó peptidek réz(II)komplexei

A **His-His** a legegyszerűbb peptid, ami egynél több hisztidint tartalmaz. A pH 4-nél képződő CuHL részecskében az N-terminális helyzetű hisztidint tartalmazó peptidekre jellemző 2N-es  $\{NH_2, N_{im}\}$  hisztaminszerű koordináció valósul meg. pH 5-6 között egy további deprotonálódás során a CuL részecske képződik, melyben az  $\{NH_2, N^-, N_{im}\}$  koordináció alakul ki. Fiziológiai pH körül a  $2 \times \{NH_2, N^-, N_{im}, N_{im}\}$  szerkezetű dimer  $Cu_2H_2L_2$  komplex képződik. A **His-His-Gly-Gly** peptid réz(II)komplexének spektroszkópai adatai alapján a továb-

bi Gly-Gly egység kapcsolása nem változtatja meg a réz(II) koordinációs módját [1,2]. Az N-terminális aminocsoportjukon védett peptidek esetében döntően megváltoznak a koordinációs sajátságok. A hisztamin típusú kötőmód helyett a hisztidin oldalláncokon keresztüli koordináció valósul meg savas kémhatású oldatban, a pH növelésével az imidazolcsoportok horgonycsoportként segítik elő az amidnitrogének deprotonálódását. Az **Ac-HHVGD-NH<sub>2</sub>** peptid esetében enyhén savas pH-n a CuHL és CuL komplexek az {N<sub>im</sub>} és {2N<sub>im</sub>,} koordinációval jellemezhetők. A CuHL részecske viszonylag nagy stabilitása arra utal, hogy a β-karboxilát csoport is enyhe kölcsönhatásban van a fémionnal. pH 6 előtt megkezdődik az amidnitrogének deprotonálódása, s pH ~ 8 felett már az {N<sub>im</sub>,N<sup>-</sup>,N<sup>-</sup>,N<sub>im</sub>} szerkezetű CuLH<sub>2</sub> részecske a domináns [5]. Az emberi β-amiloid **EVHHQK-NH<sub>2</sub>** és **EVHHQKLVFFAEDVGSNK-NH<sub>2</sub>** fragmense az N-terminális aminocsoport és a harmadik pozícióban található hisztidin révén úgynevezett ATCUN (Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-binding) motívumot tartalmaz, s pH 4,5–10,5 tartományban a rá jellemző albuminszerű {NH<sub>2</sub>,N<sup>-</sup>,N<sup>-</sup>,N<sub>im</sub>} koordináció valósul meg. Utóbbi két peptid N-terminális aminocsoportjának acetilezése jelentősen befolyásolja a részecske eloszlást és a komplexek szerkezetét. pH 4-7 között a réz(II)iont mindkét imidazol köti, majd a pH növelésével egymást követve amidnitrogének is részt vesznek a fémion komplexálásában [2,3,6,7]. A H2A típusú hiszton fehérjék C-terminális részének modelljeiként vizsgálták többek között az **Ac-TASHHK-NH<sub>2</sub>** és az **Ac-TEAHHK-NH<sub>2</sub>** peptideket, melyekre pH 3,5–6,5 között volt jellemző az imidazolnitrogének keresztüli koordináció [8].

### 3.2.1.1.b A –HXXH– szekvenciát tartalmazó peptidek réz(II)komplexei

A **His-Val-His** és a **His-Gly-His-Gly** ligandumok réz(II) jelenlétében pH 4 körül hisztamin típusú {NH<sub>2</sub>,N<sub>im</sub>} komplexet képeznek, ami His-Gly-His-Gly-nél egyetlen lépés során alakul át a már pH 5 körül domináns {NH<sub>2</sub>,N<sup>-</sup>,N<sup>-</sup>,N<sub>im</sub>} [9], mások szerint {N<sub>im</sub>,N<sup>-</sup>,N<sup>-</sup>,N<sub>im</sub>} [10] koordinációs szerkezettel jellemezhető CuH<sub>2</sub>L részecskévé. A His-Val-His esetében valószínűleg a valin oldallánc amidkoordinációt gátló hatása miatt pH 5,5 környékén előbb egy {NH<sub>2</sub>,N<sub>im</sub>,N<sub>im</sub>} szerkezetű tridentát komplex válik dominánssá. Ezután két amidnitrogén kooperatív deprotonálódása révén az előbbihez hasonló, {NH<sub>2</sub>,N<sup>-</sup>,N<sup>-</sup>,N<sub>im</sub>} koordinációjú komplex alakul ki. Mindkét peptid esetén képződött {NH<sub>2</sub>,N<sup>-</sup>,N<sup>-</sup>,N<sup>-</sup>} koordinációs szférájú részecske lúgos pH tartományban. Ligandumfeleslegnél csak a tripeptid jelenlétében tapasztalták biszkomplexek megjelenését. A réz(II)–**Ac-His-Val-His-NH<sub>2</sub>** [11] és a réz(II)–**Ac-His-Gly-His-Gly** [12] rendszerekben a CuL, CuH<sub>2</sub>L és CuH<sub>3</sub>L részecskék a fő alkotók. A kis

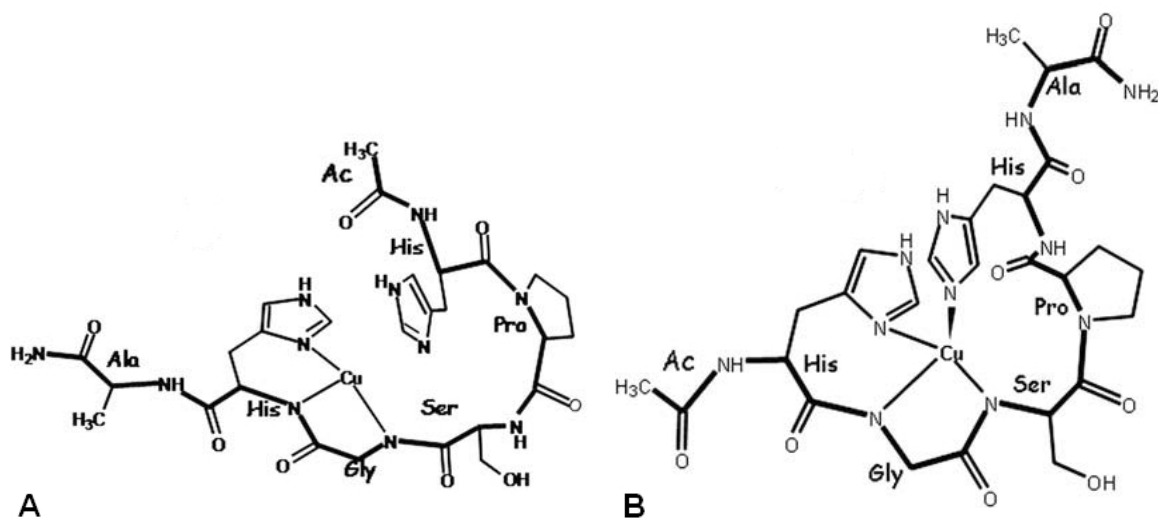
pH-n képződő  $\{2N_{im}\}$ -es CuL makrokelátot két amiddeprotonálódás során felváltja a fiziológiás pH-n domináns  $CuH_2L$  részecske, melyben  $\{N_{im}, N^-, N^-, N_{im}\}$  donoratomok veszik közre a réz(II)iont, míg erősen bázikus oldatban az egyik imidazol amidnitrogénre cserélődik. A tripeptidnél az amidnitrogének egy lépésben deprotonálódnak, a tetrapeptidnél a karboxilátcsoport elektrondonor jellege miatt elválnak a két lépcső. Az **Ac-His-Gly-His-OH** és **Ac-His-Gly-His-NHMe** peptidek tanulmányozásából is az a következtetés vonható le, hogy a karboxilátcsoport jelenléte stabilizálja a 3N-es, egy peptidnitrogént tartalmazó komplexet az  $\{N_{im}, N^-, N^-, N_{im}\}$  típusú, (7,5,6)-tagú kelátgyűrűs formáció ellenében, így utóbbi nagyobb pH-n képződik. A pH 10 felett uralkodó  $CuH_3L$  komplexek spektroszkópai paraméterei mindkét rendszerben arra utalnak, hogy az ekvatoriális sík  $\{N_{im}, N^-, N^-, N^-\}$  kötés módja kiegészül a másik  $N_{im}$  axiális koordinációjával [13]. A **Gly-His-Gly-His** tetrapeptid koordinációs viszonyai bonyolultak. A pH 4-5 körül kialakuló síknégyszetes geometriájú,  $\{NH_2, N^-, N_{im}, H_2O\}$  koordinációval rendelkező CuL komplex a His<sub>4</sub> axiális kötődése révén pH 6-ra négyszetes piramisos szerkezetbe megy át, mely pH 7-re a torzult trigonális bipiramisos geometriájú  $CuH_2L$  részecskévé rendeződik át. Az ekvatoriális síkban  $\{NH_2, N^-, N^-\}$ , az axiális helyeken  $N_{im}$  donoratomok találhatók [2].

Az említett peptidek réz(II)komplexeiben a nagy stabilitást biztosító csatolt kelátgyűrűk kialakulása miatt fiziológiás pH-n már bekövetkezik két amidnitrogén koordinációja. Ennek kiküszöbölését érték el a szarkozin (N-metilglicin) tartalmú **Ac-His-Sar-His-NH<sub>2</sub>** ligandummal, mely szekunder – fémionhoz kötődni képtelen – amidcsoporttal rendelkezik. Ligandumfelesleg esetében semleges pH-n a  $\{4N_{im}\}$ -es, kettő makrokelátból felépülő  $CuL_2$  biszkomplex a domináns, melyet csapadékképződés követ enyhén lúgos körülmények között [14].

### *3.2.1.1.c A –HXYH– szekvenciát és az egymástól még távolabb elhelyezkedő hisztidineket tartalmazó peptidek réz(II)komplexei*

A Kozłowski és munkatársai által vizsgált **SPARC fehérje fragmentumokban** találunk példát a –HXYH– motívumra [2]. A potenciometriás és spektroszkópai eredmények tükrében megállapítható, hogy a szabad terminális aminocsoport részt vesz az imidazolcsoportokkal a koordinációban, míg a védett származékok esetében az imidazol oldalláncok az elsődleges fémkötő helyek. Az említett fragmensek oldataiban pH 9-re  $\{N_{im}, N^-, N^-, N^-\}$  környezetű réz(II)komplexek válnak uralkodóvá. A Sóvágó és munkatársai által vizsgált **Ac-HVVH-NH<sub>2</sub>** peptid pH 5-6 között képződő CuL komplexének stabilitása a hisztidinek távolsága miatt kisebb, mint az **Ac-HVVH-NH<sub>2</sub>** és **Ac-HGH-NHMe** ligandumoknál meghatározott megfelelő

értékek. Ugyanakkor a két aminosavnyi távolság a  $\text{CuH}_2\text{L}$  részecske stabilizációját eredményezi, mert a törzskomplex kialakulását követő két amidnitrogén-deprotonálódás kevésbé kooperatív, mint a másik kettő peptid–réz(II) rendszerénél. Lúgos kémhatású oldatban,  $\text{pH} \sim 9$  fölött az  $\{\text{N}_{\text{im}}, 3\text{N}^-\}$  koordinált  $\text{CuH}_3\text{L}$  részecske az uralkodó [15]. Az **Ac-HVGDH-NH<sub>2</sub>** oldategyensúlyi viselkedése nagy hasonlóságot mutat az **Ac-HHVGD-NH<sub>2</sub>** peptiddel. Habár a két peptid  $\{\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}\}$  koordinált  $\text{CuH}_2\text{L}$  részecskéiben eltérő tagszámú kelátgyűrűk találhatók, az így képződő komplexek stabilitása jelentősen nem különbözik egymástól [5]. A **humán prion protein fragmenseiben** egymástól nagy távolságra levő hisztidinek vannak, melyek bázikus kémhatású oldatban egymástól független horgony szerepet töltenek be  $\{\text{N}_{\text{im}}, 3\text{N}^-\}$  koordinációs módot biztosítva a fémionok számára [16]. Az **Ac-HPSGHA-NH<sub>2</sub>** (P2) és az **Ac-HGSPHA-NH<sub>2</sub>** (P4) peptidekben a hisztidinek ugyanabban a pozícióban vannak, ennek ellenére azonos összetételű réz(II)komplexeik szerkezete és konformációja a prolin eltérő elhelyezkedése miatt különböző (3.2.1. ábra) [17].



3.2.1. ábra: A  $\text{CuH}_2\text{L}$  részecskék szerkezete a réz(II)–P2 (A) és a réz(II)–P4 (B) rendszerekben [17]

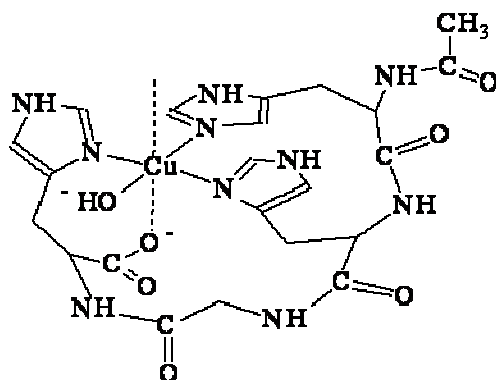
### 3.2.1.2 A három hisztidint tartalmazó peptidek réz(II)komplexei

A mindkét végükön védett, két hisztidint tartalmazó peptidek körében láthattunk példát a fémion oldalláncokon keresztül történő megkötésére egy szűk, enyhén savas pH-tartományban. A két hisztidint tartalmazó ligandumokhoz képest a három hisztidint tartalmazó peptidekkel szélesebb pH-tartományban valósul meg az oldalláncokon keresztül történő koordináció, s így lehetőség nyílna a fehérjékre jellemző modellek megvalósítására fiziológiai pH-n. A három hisztidint tartalmazó peptidek közül a –HXHYH– szekvencia kedvezményezett a –HHXH– szekvenciával szemben, mert nagyobb termodinamikai stabilitású komp-



lexek képződését teszi lehetővé. Amennyiben a peptid tartalmaz koordinálódni képes karboxilcsoportot, úgy az amidnitrogén koordinációja még nagyobb pH-n kezdődik meg.

### 3.2.1.2.a A –HHXH– és a –HXHH– szekvenciát tartalmazó peptidek réz(II)komplexei



**3.2.2. ábra:** A réz(II)–Ac-HHGH-OH rendszerben pH ~ 7 körül kialakuló Cu(OH)L részecske szerkezete [18]

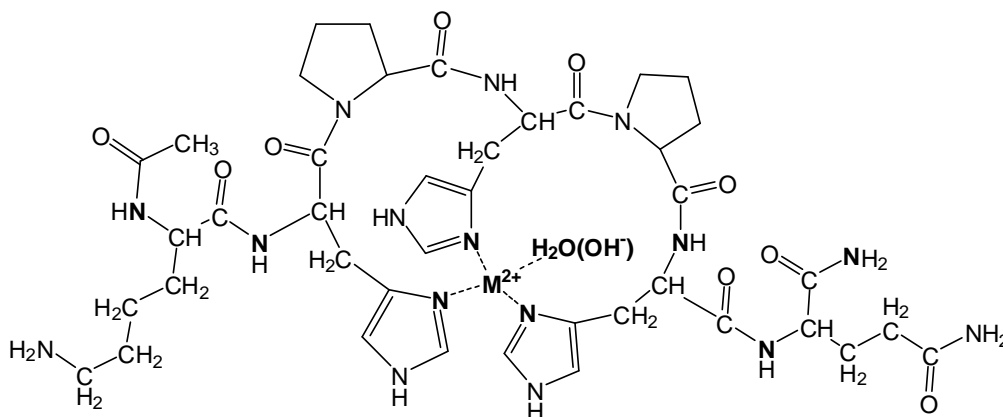
Kutatócsoportunkban vizsgáltuk az **Ac-HHGH-OH** peptid fémkomplexeit [18]. A pH 7 körül képződő  $\{3N_{im}\}$  és  $\{3N_{im}, OH^-\}$  koordinációjú CuL és Cu(OH)L komplexek említésre méltó sajátossága, hogy a legtöbb hisztidin tartalmú peptiddel ellentétben a ligandum csak a három imidazolszomszomszágán keresztül koordinálódik a fémionhoz (3.2.2. ábra). Az amidnitrogének koor-

dinációja csak pH 8 fölött jellemző a rendszerben. A semleges közegben képződő komplexek kiemelkedő SOD-aktivitással rendelkeznek, míg a pH 8 körül képződő CuH<sub>1</sub>L részecske, pontosabban az ebből kialakuló CuL(dtbc) terner komplex igen hatékonyan katalizálja a pirokatechin oxidációját oxigén jelenlétében. A karboxilátszomszomszág védésével az amidkoordináció már kisebb pH-n bekövetkezik, amint azt az **Ac-HHGH-NHMe** peptidnél tapasztalták [13]. Kevésbé látványosan, de érvényesült ez a tendencia a megfelelő tripeptideknél (Ac-HGH-OH és Ac-HGH-NHMe) is, ami a részecskék eltérő töltésével magyarázható. A prolin jelenléte az N- és C-terminális csoportjain is védett, szintén tanszékünkön előállított **Ac-HPHH-NH<sub>2</sub>** peptid esetében elsőként egy három imidazolnitrogén koordinációt tartalmazó stabil komplexet eredményezett. Réz(II)ionok jelenlétében pH 7 körül a  $\{2N_{im}, N^-, H_2O\}$  típusú koordináció jött létre, egy deprotonálódott amidnitrogén részvételével [19].

### 3.2.1.2.b A –HXHYH– szekvenciát tartalmazó peptidek réz(II)komplexei

Az **amiloid prekursor protein** (APP) His-Xaa-His-Yaa-His mintázattal rendelkező N- és C-terminális fragmenseinek nagy a réz(II)affinitásuk, pH 5 körül a három imidazol oldal-lánc által koordinálódnak a réz(II)ionhoz ekvimoláris oldatban. A pH 6-8 tartományban bekövetkező két átfedő amidnitrogén deprotonálódás során egy torzult szimmetriájú,  $\{4N+N\}$  koordinációjú komplex alakul ki. Ez utóbbi megegyezik az előbb tárgyalt Ac-His-Val-His-NH<sub>2</sub> és Ac-His-Gly-His-Gly komplexek esetén képződő  $\{N_{im}, N^-, N^-, N_{im}\}$  típusú szerkezettel, ami

egy axiális irányú imidazol-koordinációval egészül ki [20,21]. Sóvágó és munkatársai is széleskörűen vizsgálták a fenti motívum fémkötő sajátságait. A Cu,Zn-SOD enzim fémkötő helyeinek modellezése céljából előállított **Ac-HAHVH-NH<sub>2</sub>**, **Ac-HVHAH-NH<sub>2</sub>**, **Ac-HPHAH-NH<sub>2</sub>**, **Ac-HAHPH-NH<sub>2</sub>**, **Ac-HGHVH-NH<sub>2</sub>** és **Ac-HVHGH-NH<sub>2</sub>** pentapeptidekben a nemkötő oldalláncok változtatása nincs különösebb hatással a fő részecskék eloszlására és kötésmódjára. Az első detektálható részecske egy két imidazolcsoportot tartalmazó makrokelát. Ezt követően a semleges közegben megjelenik a {3 N<sub>im</sub>}-es CuL makrokelát, pH 7 felett pedig amidkoordinált {N<sub>im</sub>,N<sup>-</sup>,N<sup>-</sup>,N<sub>im</sub>} típusú részecskék dominálnak. A pH további növelésével egy harmadik amidnitrogén kiszorítja az egyik imidazolcsoportot a koordinációs szférából és a 4N-es {N<sup>-</sup>,N<sup>-</sup>,N<sup>-</sup>,N<sub>im</sub>} koordinált részecske alakul ki az oldatban. A prolintartalmú részecskék csupán egy fémiont képesek megkötni és a CuH<sub>2</sub>L valamint CuH<sub>3</sub>L összetételű részecskékben egyféle komplexszerkezet valósulhat meg. A többi peptid esetében koordinációs izomerek megjelenésére nyílik lehetőség, és a változatos sztöchiometriájú részecskék sorát gazdagítja a két- vagy többmagvú komplexek kialakulásának lehetősége [22]. Az amidnitrogén deprotonálódásának megakadályozása és a komplexek stabilitásának növelése érdekében kutatócsoportunkban egy további prolin aminosavat építettünk az Ac-HPHH-NH<sub>2</sub> peptidbe a két szomszédos His közé. Az **Ac-HPHPH-NH<sub>2</sub>** vizsgálata során réz(II)ionok jelenlétében csapadék kiválását tapasztaltunk pH 6,9 felett a CuH<sub>1</sub>L részecske megjelenésével párhuzamosan, annak ellenére, hogy a képződő törzskomplex stabilitása nagyobb volt, mint a megfelelő Ac-HPHH-NH<sub>2</sub> komplexé. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a csapadék megjelenése a ligandumot is tartalmazó kis oldhatóságú, töltéssemleges komplex kiválásának a következménye [23]. A komplexek vízdoldhatóságát érték el a pozitívan töltött Lys, illetve a hidrofíll oldalláncot tartalmazó Gln aminosavak beépítésével. Az **Ac-KHPHPHQ-NH<sub>2</sub>** peptid réz(II)komplexei vízdoldhatónak bizonyultak a teljes vizsgált pH-tartományban (pH 2–11). A CD és UV-látható spektroszkópiás adatoknak megfelelően amidnitrogén deprotonálódás csak pH 9 felett történt, ami jelentős spektrális változást eredményezett. Fiziológiai pH körül vegyes hidroxokomplexek dominálnak (3.2.3. ábra) [23]. Az **Ac-His-Sar-His-Sar-His-NH<sub>2</sub>** szarkozin tartalmú ligandum pH ~ 6 körül három imidazolján keresztül koordinálódik a réz(II)ionhoz. A következő deprotonálódási lépcsőben vegyes hidroxokomplex képződik, mely csapadék formájában kiválik az oldatból [14].



**3.2.3. ábra:** A  $\{3N_{im}\}$  koordinációt tartalmazó Ac-KHPHPHQ–NH<sub>2</sub> komplexek sematikus ábrája. A félkövér betűvel jelölt N- és C-terminális végen levő amidnitrogének koordinálódhatnak lúgos pH-tartományban a fém-ionhoz [23]

### 3.2.1.2.c A három, egymástól kettő vagy annál több aminosav távolságra elhelyezkedő hisztidint tartalmazó peptidek réz(II)komplexei

Az **Ac-HAAHV VH-NH<sub>2</sub>** heptapeptid enyhén savas tartományban képződő,  $\{3N_{im}\}$  koordinált CuL komplexe viszonylag nagy stabilitású, de a HXHYH szekvenciánál meghatározott stabilitási állandókat nem éri el. Míg ekvimoláris rendszerben lúgos pH-n az  $\{N_{im}, 3N^-\}$  környezetű CuH<sub>3</sub>L komplex izomereket takar, addig fémion felesleg esetén az N- és C-terminális hisztidinek horgony jellege miatt két réz(II)iont is képes megkötni. Az amid-nitrogén deprotonálódások ilyen körülmények között már enyhén savas oldatban elindulnak. A prion protein szekvenciák réz(II)komplexeiben savas pH-n ugyan előfordul a  $\{3N_{im}\}$  koordinációs mód, de fiziológiás pH-n amidkoordinált részecskék az uralkodók [16]. A **GVSGHGQHGVHG** alloferon modellvegyület esetében az  $\{NH_2, 3N_{im}\}$  szerkezettel átfedve pH 6,5 után indul meg az amiddeprotonálódás, az N-terminálisán acilezett származéknál egy pH egységgel hamarabb bekövetkezik a  $\{3N_{im}\}$ -es CuL részecske átalakulása [24].

### 3.2.1.3 A háromnál több hisztidint tartalmazó peptidek réz(II)komplexei

A **GHGHGHGH** peptid komplexképző sajátosságai is azt bizonyítják, hogy a réz(II)ion koordinációs szférájának alakulása nagyban függ a peptidszekvencia változásától. A hisztidinek számának növelése nem feltétlenül jelenti a számunkra kedvező, fehérjék-re/metalloenzimekre jellemző koordinációs mód kialakulását. pH 5-nél mind a négy hisztidin-imidazol koordinálódik a réz(II)ion ekvatoriális síkjában, míg magasabb pH-n a deprotonált amidcsoportok elkezdik kiszorítani az imidazolokat. Ez a tendencia érvényesül a polihisztidinnél is, ahol semleges pH-n már mind az imidazol-, mind az amidnitrogén-

donorok részt vesznek a központi réz(II)ion körül kialakuló koordinációs szférában [1]. Ezzel szemben a nagy tagszámú makrokelát hurok kialakítására képes **Ac-(PHGGGWGQ)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>** prion protein fragmens {4N<sub>im</sub>} donor típusú CuL komplexe még semleges pH-n is domináns [21]. Hasonló állapítható meg az **Ac-HGVSGHGHGVHG** alloferon szekvencia oldatkémiai viselkedéséről is. Az N-terminálisán nem védett forma {NH<sub>2</sub>,3N<sub>im</sub>} koordinációjú CuL komplexe pH 7,5 fölött közel 90%-ban van jelen [24].

A **HGDHMHNHDTK-OH** (hgd) ligandum egy bakteriális Cu,Zn-SOD enzim N-terminális 11 aminosavjával azonos peptidszekvencia. A feltételezések szerint ez az N-terminális rész szerepet játszik a réz(II) felvételében és megtartásában, elősegítve ezzel a baktérium szuperoxid gyökök elleni védekezésének hatékonyságát. A réz(II)–hgd rendszerben különböző protonáltsági állapotú egy-, két- és hárommagvú komplexek képződnek. Ekvimoláris oldatban az {NH<sub>2</sub>,3N<sub>im</sub>} koordinációjú CuHL komplex van jelen a semleges pH-tartományban. Az amidnitrogének deprotonálódása csak pH 8 felett játszódik le. Fémfelesleg esetén számos izomer komplex kialakulására van lehetőség. A pH 9,5 körül domináns Cu<sub>2</sub>H<sub>3</sub>L és Cu<sub>3</sub>H<sub>5</sub>L komplexekben valószínűleg {NH<sub>2</sub>,2N<sup>-</sup>,COO<sup>-</sup> + N<sub>im</sub>,2N<sup>-</sup>,N<sub>im</sub>}, ill. {NH<sub>2</sub>,2N<sup>-</sup>,COO<sup>-</sup> + N<sub>im</sub>,2N<sup>-</sup>,N<sub>im</sub> + N<sub>im</sub>,2N<sup>-</sup>,C=O} típusú koordináció alakul ki [25]. A **His-Sar-His-Sar-His-Sar-His-Sar** ligandummal fiziológias pH-n szintén sikerül elérni a {4N<sub>im</sub>} típusú koordinációt, pH 8 felett azonban ligandumfelesleg esetén is csapadék vált ki az oldatból [14].

### 3.2.2. A hisztidinben gazdag peptidek cink(II)komplexei

A hisztidin egységek száma és helye a peptidszekvenciában nincs olyan nagy hatással a képződő cink(II)komplexek összetételére és szerkezetére, mint azt a réznél tapasztalhattuk. Ennek fő oka, hogy a cink(II)ion affinitása az amidnitrogénhez jóval kisebb mértékű.

A **His-His** dipeptid és védett származékainak, továbbá a **His-Val-His** peptid vizsgálata szerint szabad aminos csoport jelenlétében kedvezményezett a hisztamin típusú {NH<sub>2</sub>,N<sub>im</sub>} koordináció kialakulása [26,27]. A speciális H<sub>2</sub>N–XH– szekvencia szükséges ahhoz, hogy deprotonálódhasson az amidnitrogén, mint ahogy az a cink–**His-His-Gly-Gly** rendszerrel tapasztalható. Ezzel szemben a **Gly-His-Gly-His** peptid kizárólag amino- és imidazolsz csoportjain keresztül koordinálódik a fémionhoz [9]. A mindkét végükön védett peptidek esetében semleges/lúgos pH tartományban szinte kivétel nélkül csapadék képződik, mivel a kis stabilitású Zn–N<sub>im</sub> kötések nem tudnak versengeni a cink hidrolízisével. Az 1:1 arányú cink(II)–**Ac-His-Val-His-NH<sub>2</sub>** rendszerben például nem is lehetett a már pH ~5 körül bekövet-

kező csapadékképződés miatt meghatározni stabilitási állandókat [27]. Az **Ac-His-Gly-His-OH** és **Ac-His-Gly-His-NH<sub>2</sub>** peptidek összehasonlítása egyértelműen arra utal, hogy a szabad terminális karboxilcsoport szignifikánsan növeli a megfelelő részecskék stabilitását, de ennek ellenére is ligandumfelesleg szükséges ahhoz, hogy ne képződjék csapadék. Jóval gyengébben, de az aszparatil  $\beta$ -karboxilát csoport is rendelkezik stabilizáló hatással, ami függ a hisztidin és aszparaginsav egymáshoz viszonyított helyzetétől is. Erre szolgáltatnak példát az **Ac-HVGDH-NH<sub>2</sub>** és az **Ac-HHVGD-NH<sub>2</sub>** peptidek cink jelenlétében. A  $\{2N_{im}\}$  koordinációjú makrokelát kialakulása után csapadék képződik, ami utóbbi ligandumnál – pH 10 fölött amidnitrogén koordinációnak köszönhetően – feloldódik [28]. A cink(II)–**Ac-HVVH-NH<sub>2</sub>** rendszerben képződő  $\{2N_{im}\}$  koordinált ZnL részecskéjének stabilitása hasonló az egyéb cink(II)-makrokelátoknál megfigyelt értékhez. A peptid pH ~7 felett nem képes oldatban tartani a cink(II)iont [15]. A cink(II)–**Ac-HHGH-OH** rendszerben a pH 7 körül képződő ZnL részecskében a cinktartalmú fehérjékben gyakori  $\{3N_{im}\}$  típusú koordináció valósul meg, azonban még ez sem képes oldatban tartani a cink(II)ionokat [18] lúgos körülmények között. Hasonló mondható el az **Ac-HPHH-NH<sub>2</sub>** [19] és az **Ac-HVVHAAH-NH<sub>2</sub>** [15] rendszerekről is, vagyis a terminálisan védett hisztidinben gazdag peptidek egyéb donorcsoport nélkül gyenge cink(II)kötők. A HXHYYH-szekvenciát tartalmazó peptideknél tapasztalható a legnagyobb stabilitással rendelkező komplexek létrejötte. A nem koordinálódó aminosavak nem befolyásolják a részecskeeloszlást és a bruttó stabilitást, a szarkozin tartalmú peptidek pedig nem képeztek nagyobb stabilitású komplexeket a klasszikus ligandumokhoz képest. pH ~8-ig  $\{2N_{im}\}$  és  $\{3N_{im}\}$  makrokelátok dominálnak, de a csapadékképződés itt is bekövetkezik [28,14,23]. Kivételt képez ez alól a kutatócsoportunkban előállított **Ac-KHPHPHQ-NH<sub>2</sub>** peptid, melynek komplexei vízzoldhatóak voltak pH 2–11 tartományban. Fiziológias pH körül vegyes hidroxokomplexek vannak jelen [23]. A zebrahal hisztidinben gazdag prion protein fragmensei is igen hatékonyan kötik meg a cink(II)ion(ok)t. Semleges pH-n sikerült elérni velük a fémion oldalláncokon keresztüli koordinációját [29]. A **HGDHMHNHDTK-OH** peptid cink(II) jelenlétében a semleges pH-tartományban a lizin  $\epsilon$ -aminocsoportján protonált, igen nagy stabilitású ZnHL komplexet képez. 2D NMR-vizsgálataink szerint a fémion a His1, Asp3, His4, Met5 és His6 alegységeket érintő  $\{NH_2, 3N_{im}, S_{Met}, COO^-\}$  típusú koordinációval bír. pH ~8 körül a ZnHL(OH) részecske dominál az oldatban. A fémion megkötésében nyolc donorcsoport/atom vehet részt ( $NH_2, 4N_{im}, S_{Met}, COO^-, OH^-$ ), így valószínűleg több koordinációs izomer képződik, melyek között viszonylag gyors cserefolyamatok játszódnak le [25].

### 3.2.3. A hisztidintartalmú peptidek nikkell(II)komplexei

Az N-terminális hisztidint tartalmazó peptidek nikkell(II)komplexeinek vizsgálata a réz(II)ionokhoz hasonló eredményeket mutat, azzal a különbséggel, hogy az amidnitrogén koordinációja lassabban játszódik le és semleges/enyhén lúgos tartományban kezdődik el. Amennyiben azonban ez bekövetkezik, a második (esetleg harmadik) amidnitrogén deprotonálódása erősen kooperatív jelleget mutat. A nikkell(II)–**His-Gly** 1:1 arányú rendszerben a kiindulási hisztamin típusú koordinációt tartalmazó zöld, paramágneses fémkomplex átalakul sárga színű, sík szerkezetű, diamágneses komplexszé az amidnitrogén koordinációja során. Ligandumfelesleg alkalmazása során meggátolható az amidnitrogének koordinációja, mivel bisz-hisztamin koordinációjú  $ML_2$  komplex képződik [3,30-32]. A nikkell(II)–**Gly-His** rendszer vizsgálata során azt figyelték meg, hogy a fémion körüli szabályos oktaédes geometriát az  $\{NH_2, N_{im}, N^-, 3H_2O\}$  koordináció alakítja ki. Ezt követően tetramer részecskék képződésével egyidőben a komplex színe és geometriája megváltozik, síknégyszetes, intenzív sárga színű részecske képződése során [33]. Az 1-es és 3-as pozícióban hisztidint tartalmazó **HRHRHEQEGHHDSAKHGH**, valamint a 2-es és 3-as helyzetű hisztidinnel rendelkező **SHHK-NH<sub>2</sub>** peptidekre az  $\{NH_2, N^-, N^-, N_{im}\}$  donor környezet jellemző a nikkell(II)ion körül. Az N-terminális aminos csoport acetilezése az **Ac-TESHHK-NH<sub>2</sub>** peptidnél a fémion változatos megkötését eredményezi. Az 1:1 arányú oktaédes komplexben semleges pH-n a hisztidin és glutaminsav oldalláncokon keresztüli koordináció a meghatározó [1]. A nikkell(II)–**Ac-HVVH-NH<sub>2</sub>** rendszerben pH ~8-ig a  $\{2N_{im}\}$  koordinált oktaédes szerkezetű  $NiL$  komplex a domináns. Ezt követően egyszerre deprotonálódik három amidnitrogén, melynek során kialakul az  $NiH_3L$  részecske. Az **Ac-HVVHAAH-NH<sub>2</sub>** ligandum oktaédes  $\{2N_{im}\}$  és a pH ~7 körül uralkodó  $\{3N_{im}\}$  környezetű komplexeinek stabilitása az analóg cink(II)komplexekre számolt értékekkel vethetők össze. Lúgos körülmények között vegyes réz(II)–nikkell(II) komplex kialakulására nyílik lehetőség, melyben amidnitrogén is kötődik a nikkell(II)ionhoz [15]. A **GHGHGHGH** ligandumra is az oldalláncbeli kötés mód jellemző fiziológiás pH-n, ahol a négy imidazol síknégyszetes elrendeződést mutat [1]. A Cap43 nikkell-kötő fehérje C-terminálisának a húsz- és a harminctagú fragmensét, továbbá az **Ac-TRSRSHTSEGTRSR-NH<sub>2</sub>** peptidet is vizsgálták. Semleges pH-ig az 1N-es  $\{N_{im}\}$  koordináció a jellemző mindhárom rendszerre, amit kooperatív deprotonálódások során az  $\{N_{im}, 3N^-\}$  kötés mód vált fel [34,35]. Nikkell(II)ionok jelenlétében a fémion indukálta amidnitrogén deprotonálódás csak pH 8 felett kezdődik az **Ac-HPHH-NH<sub>2</sub>** rendszerben, így a három

imidazolnitrogén koordinációt tartalmazó NiL a domináns részecske igen széles pH tartományban (pH 6,5–8,5).

A nikkel(II)ion lágyabb Lewis-sav, mint a réz(II)ion, ezért a „szoft” karakterű kéndonorokhoz viszonylag nagy az affinitása. Kozłowski és munkatársai megállapították, hogy a **Cys-Xaa-Cys** motívumot tartalmazó peptidek elsődleges donorcsoportja a tiolcsoport. A nikkel(II) megkötésében amidnitrogén csak akkor vesz részt, ha a ciszteinnel szomszédos glicin van a szekvenciában. A Ni(II)–**Ac-Cys-Gly-Cys-NH<sub>2</sub>** rendszer NiH<sub>2</sub>L részecskéjében az acetil-koenzim A szintetáz aktív központjára jellemző {2N<sup>-</sup>,2S<sup>-</sup>} szerkezet valósul meg. Szabad N-terminális peptidek esetében enyhén savas pH-n az aminos csoport is szerepet játszik a fémion megkötésében, de az oldat kémhatásának növelésével egy tiolátcsoport kiszorítja a koordinációs szférából [36]. A waglerin I nevű kígyóméreg **Cys-His** motívumot tartalmazó fragmensei is hatékonyan kötik meg a nikkel(II)iont. A cisztein egységnek kritikus szerep jut a fémkötőhely stabilizálásában. Szabad aminos csoport jelenlétében (H<sub>2</sub>N-Xaa-Cys-His- szekvencia) az albumin típusú koordináció kedvezményezett a tiolát koordinálódásával szemben, de gyenge kölcsönhatása nem zárható ki [37].

#### 3.2.4. Az elágazó láncú peptidek

Amint a fenti összefoglalóból kitűnik, a hisztidingazdag, egyenes láncú peptidek hatékony fémkötő ligandumnak bizonyulnak. Ennek ellenére még a három vagy négy hisztidint tartalmazó peptidekkel sem könnyű elérni a sokat emlegetett amidkoordináció megakadályozását, illetve hidrolizált részecskék kiválását az oldatból. Többek között kutatócsoportunkban előállítottunk olyan peptideket, melyekkel pH 5-7 között sikerült elérni a számos cink(II)- és réz(II) tartalmú enzim aktív centrumára jellemző {3N<sub>im</sub>} által koordinált komplexet. A tapasztalatok viszont azt mutatják, hogy a {3N<sub>im</sub>}, de még a {4N<sub>im</sub>} koordinációjú komplexek sem tudják meggátolni az említett előnytelen folyamatok bekövetkeztét a pH enyhe növekedésekor. További nem-koordinálódó vagy poláris oldalláncot tartalmazó aminosav beépítése szükséges ahhoz, hogy elfogadható modellvegyületről beszélhessünk.

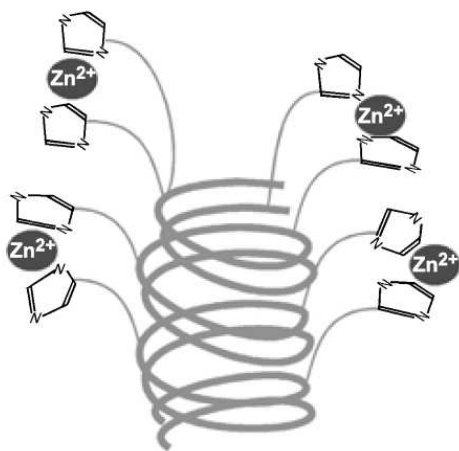
Az 1988-ban felfedezett többszörös antigén peptidek (multiple antigenic peptides, MAP) olyan ligandumok, melyek a kiindulási lizin aminosav két ága mentén ágaznak el. Sajátos szerkezetük nagy változatosságot biztosít, melynek révén számos feladatot láthatnak el [38,39]. Nagyszámú közlemény foglalkozik biológiai alkalmazhatóságukkal, például új utat nyitnak oltóanyagok tervezése területén [40-43], felhasználhatók antitestként [44-47], gyógyszerként [47-53] és gyógyszerhordozóként [54,55]. Óriási előnyük, hogy igen ellenállóak a

proteáz enzimekkel szemben [56], ugyanakkor a természetben is előfordulnak [57-59]. Sokoldalúságuknak köszönhetően alkalmasak lehetnek speciális érzékelő, diagnosztikai, katalitikus anyagok kifejlesztésére [60-66]. A fent említett alkalmazhatóságok gyakran közvetve vagy közvetlenül fémionokhoz kapcsolódnak [38,52,60,61,64,66]. Egyéb elágazó ligandumokat is alkalmaztak fémek megkötésére, nanorészecskék előállítására és katalizátorként [67-69].

Egy hisztidin funkciókkal bíró, elágazó láncú peptid magában hordozza egy hatékonyabb modellvegyület kialakításának lehetőségét, mert hajlékonyságának és eltérő hosszúságú ágainak köszönhetően megvalósulhat az oldalláncokon keresztüli fémion-koordináció. Emellett a fémion(ok)hoz való koordinálódás révén olyan egyedi szerkezetet alakíthatnak ki (pl. üreget képezhetnek), melynek döntő jelentősége lehet a szubsztrát megkötésében és a katalitikus aktivitás kifejtésében. Ilyen ligandumok fémion-koordinációjának termodinamikai és oldatszerkezeti aspektusait eddig nem vizsgálták.



### 3.3. A hisztidingazdag glikoproteinekről



**3.3.1. ábra:** A HRR feltételezett csavart szerkezete, melyről a hisztidin oldalláncok „nyúlványként” lógnak le

A hisztidingazdag glikoprotein (HRG, de gyakran találkozunk a HRGP vagy HPRG rövidítéssel, mivel prolinban is gazdag) számos gerinces vérplazmájában jelentős mennyiségben (~ 1,5 mM az emberben) előforduló makromolekula [70]. Az emberi HRG több doménből épül fel: az N-terminálison egy cisztatin szerű régió található, a központi hisztidingazdag régió (HRR) két prolinban gazdag régió (PRR) között helyezkedik el, míg a C-terminális szakasz külön domént alkot. A hisztidinek nagyrészt a HRR-ben, a prolin alegységek elsősor-

tabban ugyan, de legnagyobb számban a PRR-ben vannak. Feltehetőleg egy csavart és elnyújtott konformációba rendezik a fehérjeláncot [71] (3.3.1. ábra). E két aminosav az összes aminosav tartalom 13%-át adja [72,73]. A His-Pro-gazdag szakasz főként megőrzött, öt aminosavból álló szekvenciákból épül fel [70,72,74], a HRR 10-12 egymást követő (G)HHPH(G) – HHPHG [74,75], mások szerint GHHPH [70,72] – ismétlődő motívumot takar. Egyes vélemények szerint a tandem módon ismétlődő pentapeptid részekből kettő-kettő hisztidin imidazol oldallánc kinyúlhat a HRR vázból, ideális kötőhelyet biztosítva fémionok számára [70,71]. Több alegységből felépülő szerkezetének köszönhetően a HRG biológiai funkciói is változatosak. Számos makromolekulához kötődik, pl. plazminogénhez [76], fibrinogénhez [77], immunglobulinokhoz [78], tropomiozinhoz [75], trombospondinhez [79], hemhez [80,81] heparinhoz, ill. heparán-szulfáthoz [82,83] és kétértékű fémionokhoz [81,84,85]. Mindez egyfajta közvetítő vagy kapcsolatkialakító szerepre utal egyes molekulák között a sejtfelületen, avagy a sejtfelület és a plazma molekulái között. Közlemények sora foglalkozik a HRG biológiai folyamatokban betöltött feladatával. Szabályozó szerepet játszik a véralvadás, vérrögképződés és vérrögoldódás, leukocitavándorlás, érképződés (angiogenesis), daganatok áttételeződése és fejlődése terén [79,86-88,89-94]. Az említetteken túl antibakteriális [95] és gombaölő [96] hatással is rendelkezik. Feltehetőleg pH- és Zn(II)-szenzorként viselkedik, így a pH és/vagy Zn(II)-koncentráció befolyásolja működését [70,83]. A felsorolt folyamatokra gyakorolt hatás a fehérje különböző alegységeihez rendelhető, melyek között kiemelt szerep jut a fehérje hisztidingazdag régiójának (HRR).

A legújabb vizsgálatok szerint a fehérje a HRR révén kapcsolódik többek között a heparin és tropomiozin ligandumokhoz. Az eredmények arra mutatnak, hogy a folyamatot a réz(II)- [83] és elsősorban a cink(II)ionok [75,86,91] koncentrációja alapvetően befolyásolja. Mindez rendkívül hasonlatos ahhoz, ahogy az amiloid prekursor protein három hisztidint tartalmazó HXHYH fragmense koordinál cink(II)ionokat, és ezzel feltételezhetően modulálja a makromolekula heparinhoz való kötődését [97]. A cink(II)hez hasonló hatása van az alacsony pH-nak is a HRG-molekula heparán-szulfáthoz, illetve a sejtfelülethez való kötődésére, feltételezhetően a hisztidin imidazol gyűrűinek protonálódása révén [87]. Nem világos ugyanakkor, hogy a protonálódás/fémion-koordináció pusztán a makromolekula teljes töltésének megváltoztatása, vagy egyéb hatások, pl. konformációváltás vagy valamilyen fémion–HRG–ligandum terner komplex képződése révén befolyásolja a HRG sejthez való kötődését.

Az érképződést gátló, tumorelles, antibakteriális és gombaölő aktivitás is a His-Pro-gazdag régióhoz rendelhető. Claesson-Welsh és munkatársai szerint az antiangiogén hatás kifejtésében elengedhetetlen a HRR-szakasz kiszakadása a fehérjéből [90], sőt meghatározták az aktivitásért felelős 35 aminosavból álló minimális HRR-szegmenst [92]. Donate és munkatársai az Ac-HHPHG–NH<sub>2</sub> pentapeptiddel és az öttagú egység ismétlődésén alapuló oligopeptid szekvenciákkal – különösen az Ac-(HHPHG)<sub>4</sub>–NH<sub>2</sub> peptiddel – végzett kísérletei során a tropomiozin *in vitro* megkötésén túl sikerült reprodukálni az antiangiogén hatást *in vivo* körülmények között is [75].

A hivatkozott közlemények szinte mindegyike említést tesz arról, hogy a HRG kölcsönhatásba kerül fémionokkal (főként Zn(II)), és azok moduláló hatása szükséges az adott feladat ellátásához. A fémionok megkötéséért a hisztidingazdag alegység a felelős, mely cink(II)en kívül a hemet, a Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> ionokat is rendkívül erősen koordinálja [80,81,84,85]. Ezt igazolták azon vizsgálatok is, melyek célja a HRG kvantitatív analízisére alkalmas módszer kifejlesztése volt [98]. A módszer a nikkel(II)-NTA (nitrilo-trieetsav) komplex rekombináns HRG HRR alegységéhez való kiemelkedő affinitásán alapult. Az eredmények gyakorlati hasznuk mellett, rávilágítanak arra is, hogy a HRR-hez kötött fémionok potenciális kötőhelyek lehetnek egyéb kismolekulák számára. A HRG és egyéb szérumfehérjék (albumin, α<sub>2</sub>-makroglobulin, transferrin, hemopexin) közötti cinkkompetíciós vizsgálatok a HRG cinkszállító szerepére utalnak [84,85]. A natív fehérje és a (GHHPHG)<sub>5</sub>G oligopeptid réz(II)komplexeivel elvégzett ESR és MS-kísérletek azt valószínűsítik, hogy a fémionokat a HRR GHHPH egységenként köti meg [99,100].

A HRG fehérjékhez kapcsolódó szabályozó mechanizmusok részletesebb megismeréséhez elengedhetetlen a makromolekula fémkötő sajátságainak feltárása, ami a HRR szakasz

peptid-szekvenciáinak, illetve azok fémkomplexeinek tanulmányozásával megvalósítható. Az emberi HRG hisztidingazdag régió ismétlődő fragmenseinek valamint a peptid–fémion rendszereknek az oldategyensúlyi és oldatszerkezeti vizsgálatai tisztázhatják a kérdéses szekvenciák protonálódási viszonyait és az egyes fémionokkal alkotott komplexek összetételét és szerkezetét, melyből a makromolekula fémkötő sajátosságaira is lehet következtetni. Eltérő fémionok alkalmazásával és változatos fémion–peptid rendszerek tanulmányozásával információt nyerhetünk a HRG potenciális fémionszállító szerepéről is.

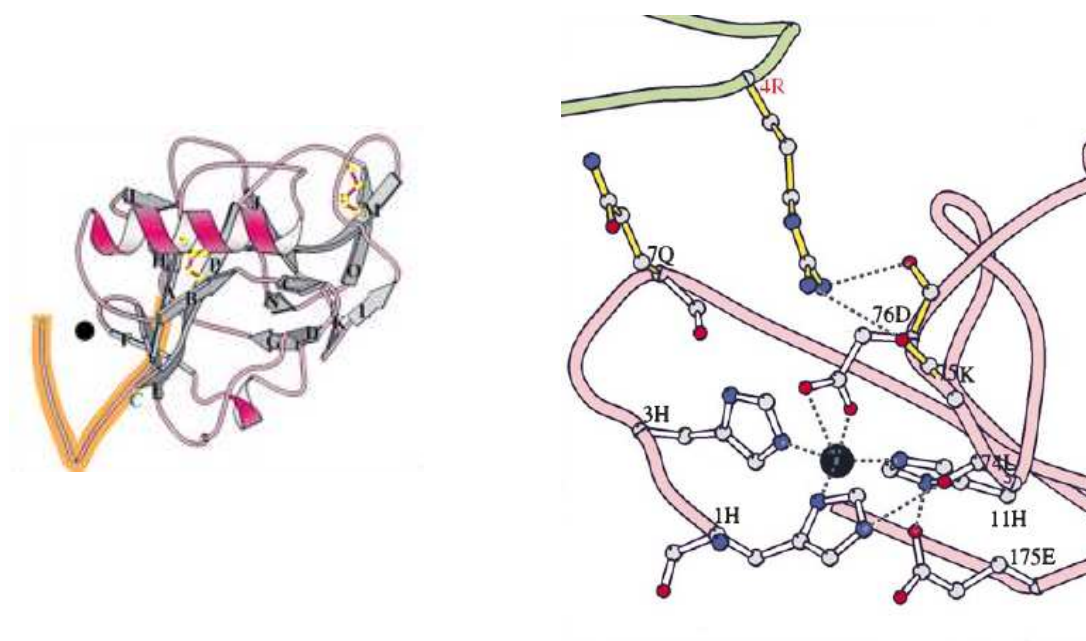
### 3.4. Az endostatin és az angiogenesis

Az emberi endostatin a XVIII-as típusú kollagén C-terminális doménjének proteolitikus hasadása során keletkezik a sejten kívüli térben. A 20 kD tömegű, 183 aminosavból álló, cink-tartalmú fehérje egy a szervezetben természetes módon képződő ígéretes rákellenes, úgynevezett antiangiogén szer [101-103].

A már meglévő erekből újak képződését nevezzük angiogenesisnek. Az angiogenezis (érképződés, érújdonképződés) számos élettani folyamatban – a reprodukcióban, a fejlődésben és a szöveti károsodások kijavításában – meghatározó jelentőségű. Ezenkívül több patológias folyamat részjelensége, így bizonyos gyulladásos megbetegedések, a tumornövekedés és áttétek képződése tartoznak ide [104]. A szervezetben jelen vannak olyan faktorok, amelyek elősegítik az érképződést, és vannak olyanok is, amelyek gátolják. Számos rákos betegségben a gátlás és a serkentés finoman összehangolt aránya felborul, a serkentés túlsúlyba jut, ami kóros sejtburjánzáshoz, daganatképződéshez vezet. A Folkman által izolált endostatin az állatkísérletek során az egyik leghatékonyabb, mellékhatások nélküli angiogenesis inhibitornak bizonyult [105-109]. Hatása az érképződés folyamatainak – többek között az erek belső falát borító endothelsejtek osztódásának és vándorlásának gátlásához – rendelhető [102].

A fehérjekristályban a cinkion az endostatin N-terminális His1, His3 és His11 imidazolgyűrűihez és az Asp76 karboxilátcsoportjához kötődik (3.4.1. ábra) [109]. A cink szerepét illetően ellentmondásos cikkek láttak napvilágot, de a legújabb kutatások szerint a fémion jelenléte szükséges a rákellenes hatás kifejtéséhez. A His1 és His3 cseréje alaninra, ill. az első négy aminosav (HSHR) eltávolítása a cinkkötő képesség és tumorelles aktivitás elvesztését eredményezi [110,111]. Javaherian és munkatársai kimutatták, hogy a 25 tagú <sup>1</sup>HSHRDFQPVLHLVALNSPLSGGMRG N-terminális fragmens és a teljes fehérje tumorelles aktivitása megegyezik [112]. A szerzők {3N<sub>im</sub>,H<sub>2</sub>O} koordinációs környezetet javasolnak a cink(II) körül, ami megkérdőjelezhető, hiszen nem védett N-terminális hisztidin esetén a hisztaminszerű {NH<sub>2</sub>,N<sub>im</sub>} kelát képződése az elsődleges cinkkötő hely [1]. A fémion-

nak feltehetően szerkezetépítő szerepe van, de a cinkkel való kölcsönhatás részletei, illetve az általa kialakított oldatszerkezet nem ismert.



**3.4.1. ábra:** Az endostatin és a cinkkötőhely kristályszerkezete

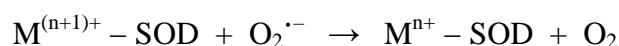
Érdekes, hogy az endostatin a szabad N-terminális aminocsoport és a harmadik helyen található hisztidin révén úgynevezett ATCUN (**A**mino **T**erminal **Cu(II)**- and **Ni(II)**-binding) motívum is, mely igen hatékony réz(II)kötő hely számos fehérjében, mint például a réz szállításáért felelős szérumalbuminban [113]. Fontos megemlíteni, hogy a réz(II) serkenti az endothelsejtek osztódását és vándorlását, valamint szükséges a tumorsejteknek számos érképződést serkentő faktor kiválasztásához. A réz(II) megkötése lecsökkenti sok ilyen faktor kiválasztását, ami így közvetve az érképződés gátlását, rákellenes hatást jelent [114]. Ez indokolta az általunk előállított peptid rézkötő képességének vizsgálatát, mely akár biológiai jelentőséggel is bírhat.

Az endostatin nagy mennyiségben történő előállítását övező nehézségek miatt az első fázisú humán klinikai vizsgálat elhúzódott, viszont eredménye ígéretesnek bizonyult a rákgyógyítást illetően. E két tény növelte témaválasztásunk aktualitását, hiszen egy kisméretű, nagy mennyiségben és kedvezőbb áron előállítható modellkomplexszel a terápiás alkalmazhatóság sokkal praktikusabb lehetne. A várakozásokkal ellentétben a 2006-ban publikált második fázisú kísérletek azzal a következtetéssel zárultak, hogy a rekombináns emberi endostatinnal kezelt, előrehaladott neuroendokrin tumorról rendelkező páciensekben a daganat

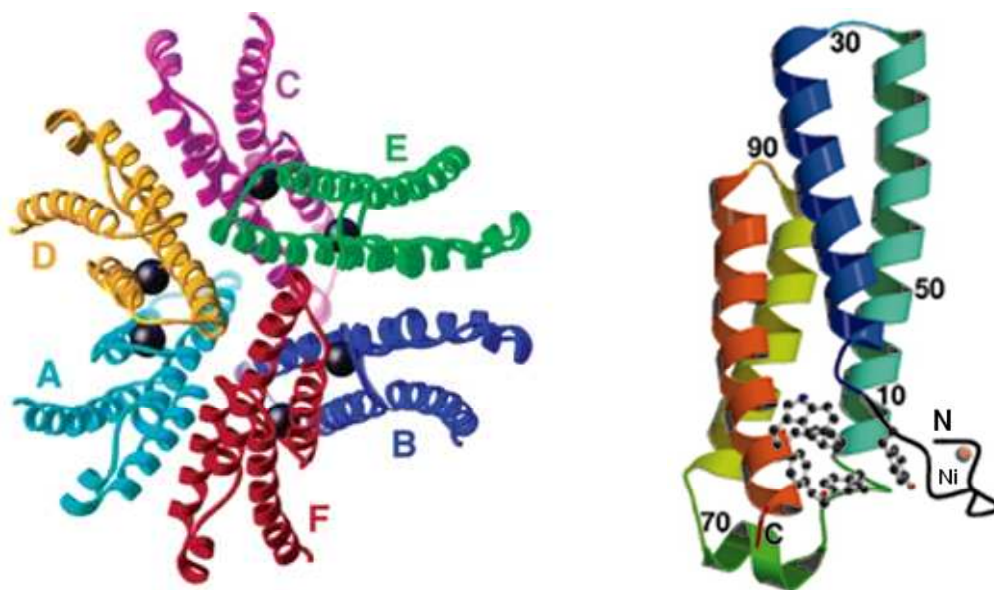
mérete szignifikánsan nem csökkent [115]. A vizsgálatok eredményei többek között arra utalnak, hogy a betegeknek adott endostatin jelentős részét a szervezet lebontotta. Egy kis molekulatömegű peptidkomplex biokémiai viselkedése viszont eltérhet egy nagyobb méretű fehérjétől, becsomagolható pl. olyan hordozó molekulába, mely segít abban, hogy a biomolekula eljusson arra a helyre, ahol hatását ki tudja fejteni.

### 3.5. A nikkeltartalmú szuperoxid-dizmutázokról

Az aerob szervezetek metabolizmusa során jelentős mennyiségű reaktív oxigénszármazék képződik, melyek közül a szuperoxid gyökanyon ( $O_2^{\cdot-}$ ) az egyik legkárosabb. A reaktív oxigénszármazékok, és általában a szabadgyökök okozta oxidatív stressz kivédésére számos védelmi mechanizmus fejlődött ki. A szuperoxid gyökanyon elbontására a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimek szakosodtak. A legutóbbi időkig ezeknek két nagyobb csoportját különböztetjük meg. A legismertebb a kétmagvú Cu,Zn-SOD enzimek családja, melyben a réz felel a katalitikus hatásért, míg a cinknek szerkezetalkotó hatása van. Az egymagvú, mangánt vagy vasat tartalmazó Mn/Fe-SOD enzimek alkotják a második csoportot. Az aerob élővilágban betöltött jelentős szerepükre tekintettel a fenti SOD enzimek rendkívül kiterjedt vizsgálatok tárgyát képezték, s mára működésük részleteit is tisztázták. Az aktív központban levő fémion (M) mind oxidált, mind redukált formában reagál a szuperoxid-gyökkel az alábbi általános reverzibilis működési mechanizmus szerint.



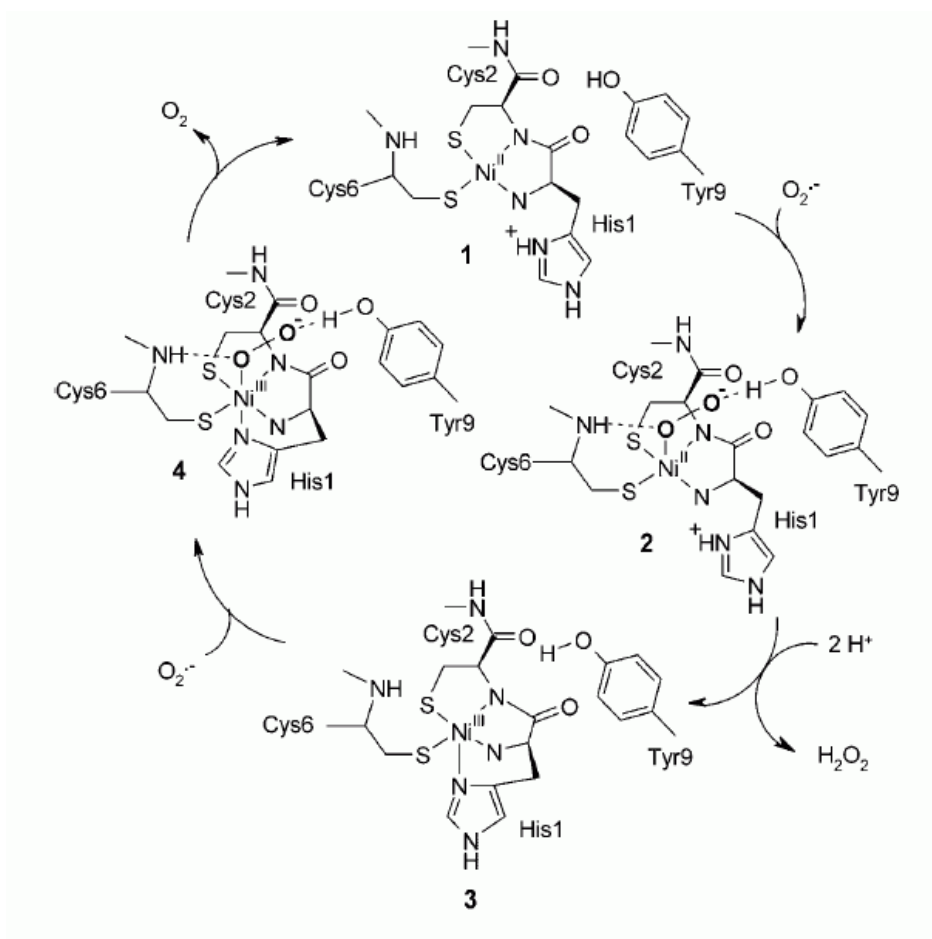
Az elmúlt években számos a fentiektől alapvetően eltérő, aktív centrumukban nikkelt tartalmazó SOD enzim is ismertté vált [116,117]. Ezeknél a Ni-SOD enzimeknél a fémion megkötésében csak néhány N-terminális, egymáshoz közeli aminosav alegység vesz részt, ami szinte egyedülálló lehetőséget teremt azok szerkezeti és működési modellezésére. A *Streptomyces*- és *cianobaktériumok* családjában több olyan faj található, melyben a nikkelt mind oxidált, mind redukált formája kizárólag az N-terminális végen található, jól megőrzött  $^1HCDGPC$ , illetve  $^1HCDLPC$  szekvenciához kötődik. A *Streptomyces seoulensis* és *Streptomyces coelicolor* baktériumokól izolált Ni-SOD fehérjék kristályszerkezetét 2004-ben határozták meg [118,119]. Mindkét enzim hexamer harmadlagos szerkezettel rendelkezik és monomerenként egy nikkelliont tartalmaz (3.5.1 ábra).



**3.5.1. ábra:** A Ni-SOD hexamer és monomer szerkezete

A nikkellionhoz a His1, Cys2 és Cys6 alegységek koordinálódnak, ezért Ni-hurokként is említi a szakirodalom ezt a fehérjeszakaszt. Biokémiai vizsgálatok szerint a fémion nélküli apoenzim kifejeződésekor a szekvencia metioninnal kezdődik. Ez a „nulladik” pozícióban található aminosav akkor hasad le, amikor a nikkell(II)ion az utána található hisztidinhez és ciszteinhez kötődik. A következő lépésben az eddig *transz* Leu4-Pro5 kötés *cisz* konformációba fordul, s lehetővé válik a Cys6 alegység koordinációja is. Ennek során kialakul a Ni-SOD enzim redukált, diamágneses formájára jellemző  $\{NH_2, N^-, S^-, S^-\}$  síknégyszetes geometria. Spektroszkópiai és röntgen-kristallográfiai vizsgálatok alapján a paramágneses tulajdonságú oxidált enzim aktív központja négyszetes piramis szerkezetű, melyben a His1 imidazol oldal-lánca axiálisan koordinálódik a nikkell(III)ionhoz. A Ni-SOD működésének mechanizmusa részleteiben még nem tisztázott, az eddigi eredményeket, feltételezéseket a 3.5.2. ábra mutatja be [119,120]. A szuperoxid-gyök a redukált enzim nikkell(II)ionjának üres, a His1 oldal-lánccal ellentétes axiális kötőhelyét foglalja el a szekvencia kilencedik helyén található tirozin fenolos hidroxilcsoport irányító hatásának segítségével. A Tyr9 és/vagy a Cys6 peptidnitrogénje stabilizálja az átmeneti terméket, és a  $O_2^{\cdot-}$  egy elektron és két proton felvételével hidrogén-peroxiddá alakul, mely lehasad az immár nikkell(III)-at tartalmazó aktív centrumról. A harmadik lépésben az ellentétes axiális oldalról a His1 imidazolcsoportja kötődik a fémionhoz. Az oxidált forma szabad axiális helyére köt be a második  $O_2^{\cdot-}$ , amihez szintén a Tyr9 oldallánc és a Cys6 amidnitrogén irányító/stabilizáló szerepe szükséges. A nikkell(III) oxidálja a szuperoxid-gyököt, és a képződő  $O_2$  valamint az imidazolcsoport eltávozik a nik-

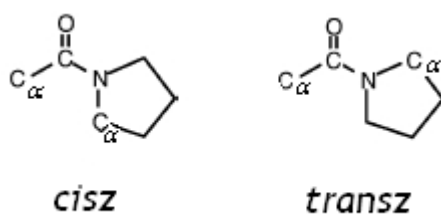
kel(II) koordinációs környezetéből, melynek révén visszaalakul a síknégyszetes elrendeződés a fémion körül.



**3.5.2. ábra:** A Ni-SOD feltételezett működési mechanizmusa

Az utóbbi időkben közlemények sora foglalkozik a Ni-SOD enzimek szerkezeti és funkcionális modellezésével. Shearer szintetikus szerkezeti modelljeinek vizsgálata arra utal, hogy az amino/amid együttes fémion körüli koordinációnak a nikkel(II) elektrosztatikus szabályozásában van szerepe. E (redoxi)enzimekben szokatlan kötési mód továbbá megvédi a nikkelhurok tiolcsoportjait az oxidációtól [121,122]. A kutatócsoportja által előállított N-terminális 12 tagú peptid nikkel(II)komplexének spektroszkópiai tulajdonságai jól egyeznek a redukált enzimével, és a szervetlen komplexekkel ellentétben hatékony működési modellnek bizonyult. A peptid N-terminálisának acilezésekor amidnitrogén helyettesíti az aminocsoportot, ami két nagyságrenddel csökkentette a katalitikus aktivitást [123,124]. Shearer és munkatársai előállították a héttagú fragmenst és annak két módosított változatát is, melyekben a hisztidint aszparaginsavval, illetve alaninnal helyettesítették. A natív enzimmel végzett hasonló kísérletekkel ellentétben a katalitikus hatás nem szűnt meg az axiális imidazol koordinációjának hiánya miatt. Az eredeti peptid nikkel(II)komplexéhez képest viszont kisebb SOD-aktivitás volt

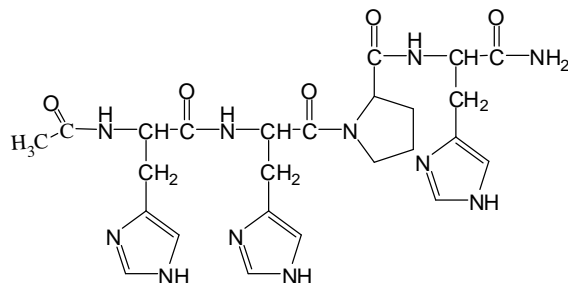
megfigyelhető a mutáns metallopeptidek esetében. A szerzők továbbá azt állítják, hogy a HCDLPCG peptid nikkellek komplexében a nikkellek(II) oxidációját követően a His1 imidazole elfoglalja az axiális pozíciót, és ezek után az egész katalitikus ciklus alatt kötött állapotban van [125]. Weston és munkatársai hat és kilenc tagú metallopeptideket vizsgáltak, és szintén arra a következtetésre jutottak, hogy a His1 nélkülözhető az adott funkció ellátása szempontjából, melyet elméleti számítások is alátámasztottak [120,126,127]. A kilenc tagú N-terminális szakasz NMR-adatai alapján megállapították, hogy a peptidben a Leu4-Pro5 kötés *transz*, míg az enzimből *cisz* konformációjú (3.5.3. ábra). Álláspontjuk szerint az aktivitás azért marad meg, mert így a Pro5-Leu4 peptid kötés karbonil csoportja részben el tudja látni az ötödik donorcsoport feladatát [120]. Annak ellenére, hogy a fenti peptidekkel foglalkozó cikkek tartalma több ponton átfed munkánkkal, egyik sem nyújt pontos leírást a nikkellek(II)komplexelek oldatbeli viselkedéséről.



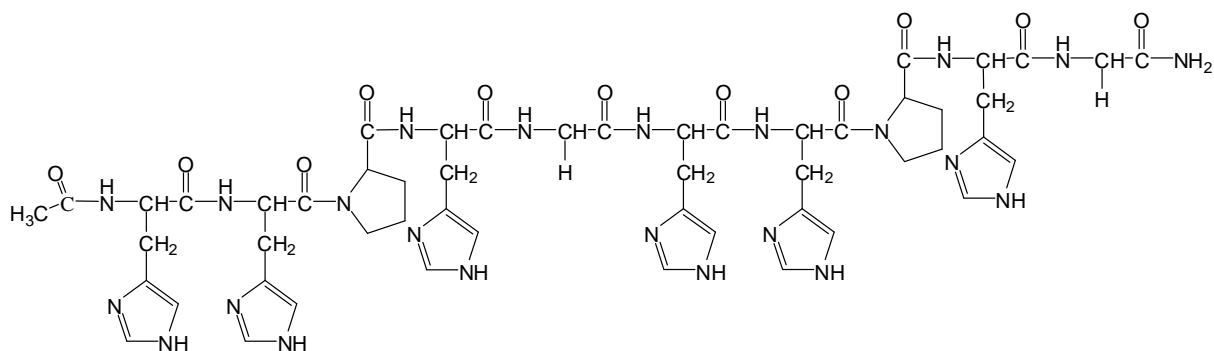
**3.5.3. ábra:** A prolin *cisz-transz* izomériája



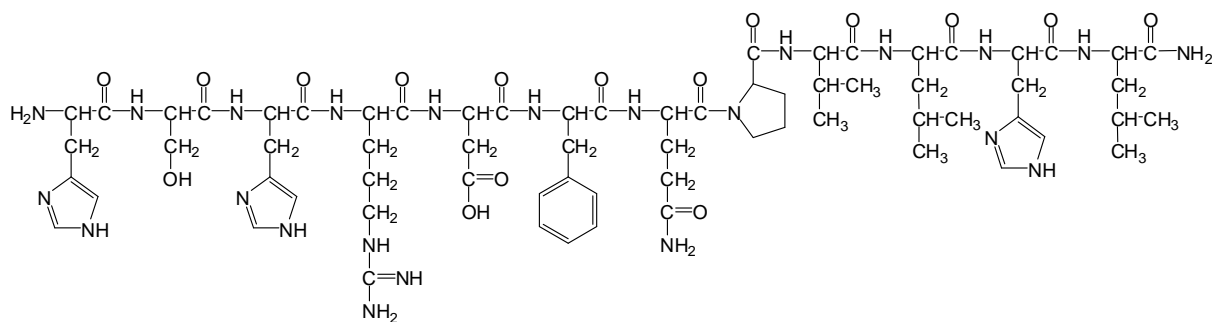
#### 4. A vizsgált ligandumok szerkezete



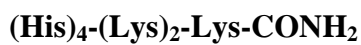
**Ac-HHPHG-NH<sub>2</sub>**



**Ac-HHPHGHHPHG-NH<sub>2</sub>**



**HSHRDFQPVHL-NH<sub>2</sub>**

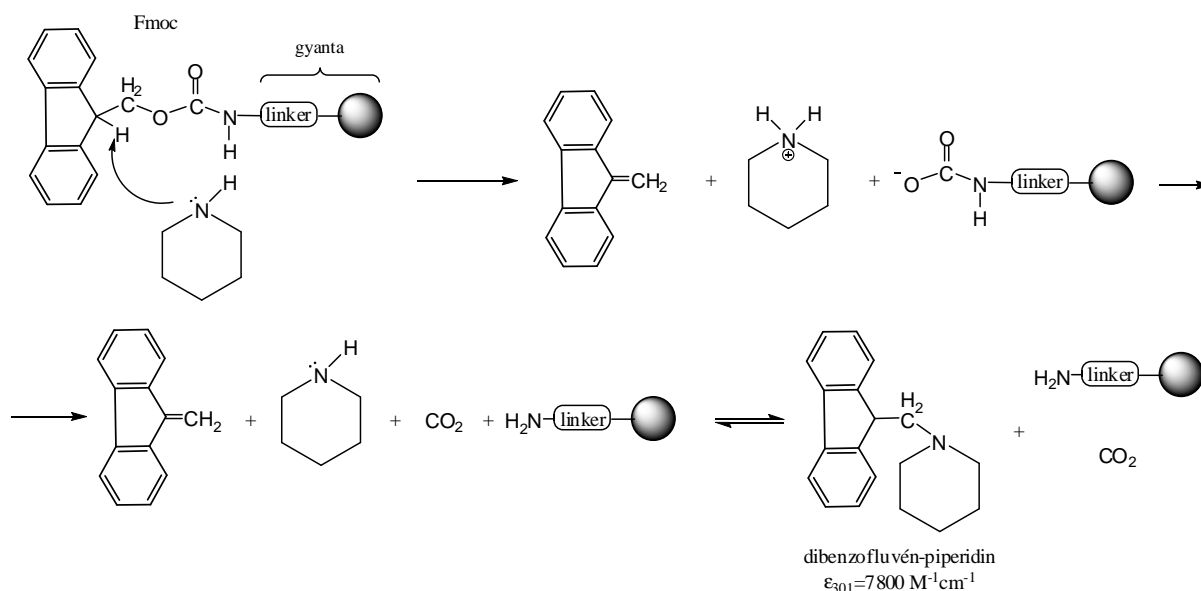


## 5. Kísérleti és vizsgálati módszerek

### 5.1. A ligandumok előállítása, a szilárd fázisú peptidszintézis

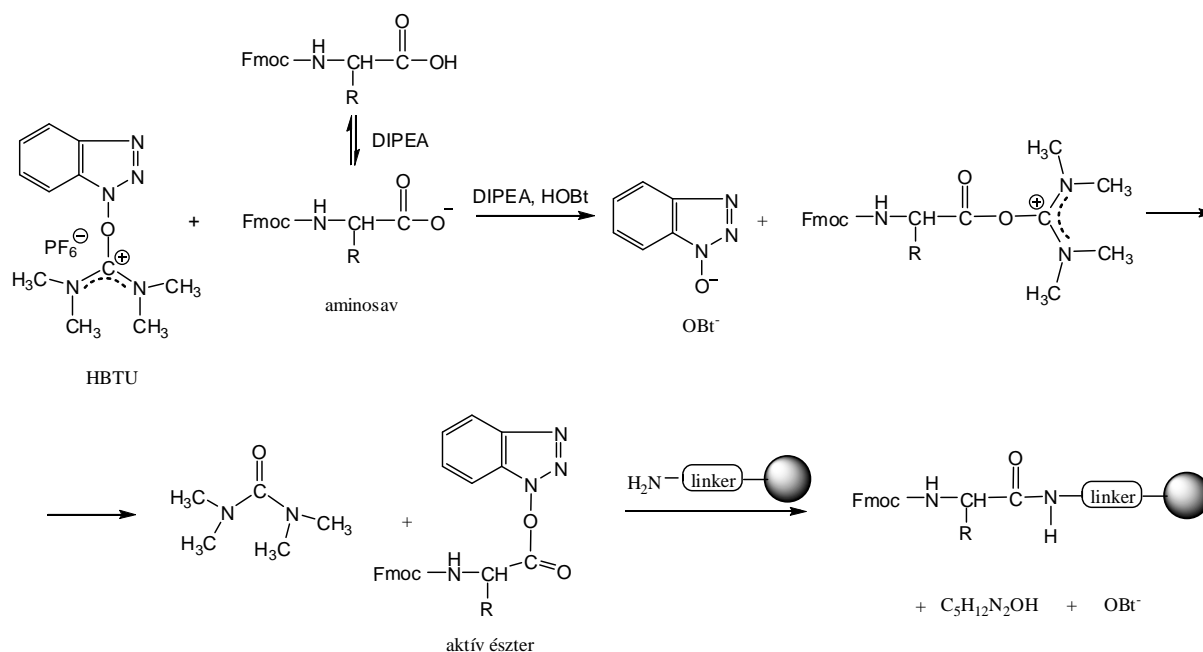
A Ni-SOD modell HCDLPCG-NH<sub>2</sub> 98,3%-os tisztaságú, 36% víztartalmú heptapeptidet az EZBiolab cégtől vásároltuk, és további tisztítás nélkül használtuk fel a mellékelt tömegspektrum és kromatogram megtekintése után. A HRG és endostatin fragmenseket, valamint az elágazó láncú peptidet tanszékünkön állítottuk elő szilárdfázisú peptid szintézissel, *Fmoc*-stratégiát követve.

A szilárd fázisú peptidszintézis aminosavak heterogén közegben lejátszódó kapcsolásának sorozata. A szilárd hordozóról, *Rink Amide* gyantáról (Iris Biotech GmbH, borítottsága 0,25-0,27 mmol/g) bázisérzékeny *Fmoc* (9-fluorenil-metoxi-karbonil) védőcsoporttal ellátott aminocsoport-kötőhelyek ágaztak le. A kapcsolási reakciók előtt a védőcsoportot piperidin 20 % (v/v)-os N-metil-pirrolidonos (NMP) oldatával lehasítottuk (1×2 perc, aztán 1×15 perc), majd a gyantát NMP-vel mostuk (5.1.1. ábra). A gyantáról lecsöpögő piperidines oldatrészleteket összegyűjtve, majd megfelelően hígítva dimetil-formamiddal a felszabadult kötőhelyek száma spektrofotometriásan meghatározható, ugyanis a hasítás során képződő dibenzofluvén-piperidin adduktnak jellegzetes elnyelése van az UV-tartományban ( $\epsilon_{301\text{nm}} = 7800 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ).



5.1.1. ábra: Az *Fmoc* védőcsoport eltávolítása során lejátszódó reakciók

Ezt követően a gyantára öntöttük az  $\alpha$ -aminocsoportján szintén Fmoc-kal védett első aminosav és a kapcsoláshoz szükséges további három reagens NMP-s oldatát. Az *O*-benzotriazol-tetrametiluronium-hexafluorofoszfát (HBTU) és az *1*-hidroxibenzotriazol (HOBt) kapcsolószerek *diizopropil-etilamin* (DIPEA) szerves bázis jelenlétében aktív észtert képeznek az aminosavval, mely könnyen reagál a szabad aminocsoporttal. A szintézis során a fentiek alapján számított kötőhelyhez képest négyszeres aminosav és HOBt, valamint 3,8-szeres HBTU és 7,8-szeres DIPEA mennyiséget használtunk. (A kitermelést csökkentő mellékreakciók miatt kellett utóbbi kettőből kevesebbet bemérni.) A reakció során a gyanta szabad aminocsoportjához az első aminosavat karboxilátcsoportján keresztül kapcsoltuk (5.1.2. ábra).



5.1.2. ábra: A kapcsolás során lejátszódó reakciók

A gyantát NMP-vel mostuk, és a következő lépésben a szabadon maradt (el nem reagált) aminocsoportokat acetileztük. Ennek során a gyantát 10% (v/v) ecetsavanhidridet és 5% (v/v) piridint tartalmazó diklórmetánban 15 percig állni hagytuk (időnként megkevertük), majd a kezelést friss reagenssel megismételtük. Ez a művelet megakadályozza, hogy az újabb kapcsolási folyamatnál a következő aminosav a szabadon maradt helyekre kötődjön.

A mosást követően a továbbiakban a fenti lépések körfolyamatként ismétlődtek más-más aminosavakkal (Fmoc lehasítása/mosás/kapcsolás/mosás/acetilezés/mosás). Az aminosavak oldalláncai savérzékeny védőcsoporttal voltak ellátva, így az átlagosan 30 percig tartó kapcsol-

lások során mellékreakcióban nem vettek részt. A kötődés sikerességét a *Kaiser-teszt* segítségével követtük nyomon, amely a ninhidrin és a szabad aminos csoport közötti színreakción alapul. A szükséges oldatok: (1) *fenol* (8 g fenolt oldunk 2 ml abszolút etanolban); (2) *KCN* (13 mg kálium-cianidot oldunk 20 ml desztillált vízben ( $c = 0,01 \text{ mol/dm}^3$ ), majd ebből 20  $\mu\text{l}$ -t piridinnel 1 ml-re hígítunk); (3) *ninhidrin* (1,0 g ninhidrint oldunk 20 ml absz. etanolban). Mindhárom oldatból 2-2 cseppet tettünk a néhány gyantaszemcséből álló mintára egy kisméretű kémcsőbe, melyet 2 percre forrásban lévő vízbe merítettük. Sikeres kapcsolás esetén nem volt szabad aminos csoport, nem volt kék elszíneződés, míg pozitív teszt esetén meg kellett ismételni a kapcsolási lépést.

Az utolsó sikeres kapcsolás után is eltávolítottuk az Fmoc védőcsoportot. A HRG fragmensek N-terminális végét a már ismertetett módon acetileztük. Ezután a gyantát többször átmostuk NMP-vel, majd kloroformmal és metanollal. Exikkátorban szárítottuk legalább egy éjszakán át. (Habár bizonytalanul, de a tömegnövekedés alapján is következtethettünk a kapcsolási reakciók sikerességére.)

A szárítást követően a peptidet lehasítottuk a gyantáról. Az *Fmoc* alapú szintézis során egy lépésben történt a peptid, illetve az oldalfunkciók savérzékeny védőcsoportjainak (tritol, Boc, Pbf, tBu) eltávolítása. A hasító elegy 95% trifluorecetsavat (TFA), 2,5% vizet és gyökfogóként 2,5% trietil- vagy triizopropil-szilánt tartalmazott. A szobahőmérsékleten 1,5-2 órán át tartó kevertetés során a peptid savamid formában szakadt le a gyantáról. A reakcióelegyet szűrtük, majd a TFA-t rotációs vákuumbepárlón ledesztilláltuk. A desztilláció során a hőmérsékletet a peptidek izomerizációjának elkerülése érdekében alacsony értéken (maximum 40-45 °C-on) tartottuk. A bepárlás befejezésekor a lombikban maradó kevés (2-3 ml) oldatot jelentős mennyiségű (40 ml) hűtött dietil-éterhez csepegtettük, melynek hatására a peptid pelyhes csapadékként kivált. A peptidet 6000 rpm fordulatszámon centrifugálással választottuk el, majd az éteres mosást és az ezt követő ülepítést többször megismételtük az éterben oldódó szerves szennyezők eltávolítása érdekében. A termék azonosítása ESI-MS-sel, tisztítása pedig HPLC-vel történt, amit liofilizálás követett.

## 5.2. Folyadékkromatográfia (HPLC)

A nyers peptideket fordított fázisú folyadékkromatográfia segítségével tisztítottuk, melyhez egy automata mintaadagolóval és eluens gáztalanítóval ellátott Shimadzu LC20 Prominence típusú HPLC készüléket használtunk. A peptidcsoportok fényelnyelését 215 nm-en kétsatornás UV detektorral követtük. A komponensek elválasztása az elágazó láncú peptid esetében állandó (izokratikus), a HRG és az endostatin fragmensek esetében változó (gradiens elúció) mozgófázis összetétellel volt megvalósítható.

A **(His)<sub>4</sub>-(Lys)<sub>2</sub>-Lys-CONH<sub>2</sub>** peptidet a szennyezésektől XTerra MS C18 (300×19 mm belső térfogatú, 7µm szemcseméretű) preparatív oszlopon izokratikus körülmények között választottuk el: 95% H<sub>2</sub>O (0,1 % (v/v) TFA), 5% acetonitril eluens összetétel és 4 ml/perc áramlási sebesség mellett ( $R_t$  = 43-50 perc).

Az **Ac-HHPHG-NH<sub>2</sub>** pentapeptidet Supelco Discovery BIO Wide Pore C18 (250×10 mm, 5 µm) félpreparatív oszlopon, 0,1 % (v/v) TFA-t tartalmazó víz és acetonitril elegyével eluáltuk (A eluens: H<sub>2</sub>O, 0,1% TFA, B eluens: CH<sub>3</sub>CN). Az elúció programja (a B eluens százalékos részarányának megadásával) a következő volt: 0-2 perc 0-1% B (lineáris gradiens); 2-14 perc 1% B (izokratikus); 14-20 perc 1-2% B (lineáris gradiens); 20-21 perc 2% B (izokratikus); 21-23 perc 2-3% B (lineáris gradiens); 23-26 perc 3 % B (izokratikus); 26-31 perc 3-15% B (lineáris gradiens); 31-32 perc 15-0 % B (lineáris gradiens); 32-37 perc 0% B (izokratikus);  $R_t$  = 22,9-32,5 perc

Az **Ac-HHPHGHHHPHG-NH<sub>2</sub>** decapeptidet Supelco Discovery BIO Wide Pore C18 (250×10 mm, 5 µm) félpreparatív oszlopon, 0,2% (v/v) TFA-t tartalmazó víz, acetonitril és TFA nélküli víz elegyével eluáltuk (A eluens: H<sub>2</sub>O, 0,2% TFA, B eluens: CH<sub>3</sub>CN, Eluens C: H<sub>2</sub>O). Az elúció programja a következő volt: 0-4 perc 5% B (izokratikus); 4-6 perc 5-7 % B (lineáris gradiens); 6-12 perc 7 % B (izokratikus); 0-12 perc 47.5 % C (lineáris gradiens); 12-15 perc 7-10 % B, 47.5-45% C (lineáris gradiens); 15-17 perc 10-20% B, 45-40% C (lineáris gradiens); 17-22 perc 20% B, 40% C (izokratikus); 22-25 perc 20-5% B, 40-5% C (lineáris gradiens); 25-30 perc 5% B, 5% C (izokratikus);  $R_t$  = 14,7-19,6 perc.

A **HSHRDFQPVLHL-NH<sub>2</sub>** tizenkét tagú peptidet Supelco Discovery BIO Wide Pore C18 (250×10 mm, 5 µm) félpreparatív oszlopon, 0,1% (v/v) TFA-t tartalmazó víz és acetonitril elegyével eluáltuk (A eluens: H<sub>2</sub>O, 0,1% TFA, B eluens: CH<sub>3</sub>CN). Az elúció programja (a B eluens százalékos részarányának megadásával) a következő volt: 0-10 perc 20-30% B (lineáris gradiens); 10-15 perc 30-40 % B (lineáris gradiens); 15-20 perc 40-20% B (lineáris gradiens); 20-30 perc 20% B;  $R_t$  = 10,1-12,1 perc.

Utóbbi három peptidnél az eluens áramlási sebessége 3 ml/perc volt és a gyűjtött csúcsok tisztaságát Supelco Discovery BIO Wide Pore C18 (250×4,6 mm, 5 µm) analitikai kolonnán ellenőriztük, valamint tömegspektrometriával azonosítottuk. A peptidoldatokat ezt követően liofilizáltuk, melynek révén szilárd állapotban, trifluoracetát sóként, ~ 40%-os kitermeléssel nyertük ki a ligandumokat.

### 5.3. Tömegspektrometria (ESI-MS)

A peptideket a pontos (monoizotópos) molekulatömeg ismeretében egy Finnigan TSQ-7000 tripla kvadrupol analizátoros, elektropray ionizációs (ESI) ionforrással ellátott Finnigan-MAT, San Jose, CA tömegspektrométerrel azonosítottuk. A készüléket pozitív ion módban használtuk (tömegtartomány: 10–2500 m/z), a kapilláris feszültség 4,5 kV volt, köd-képző gázként N<sub>2</sub>-t használtunk. A nyers peptidek vizes oldatát, illetve a folyadékkromatográfiás tisztítás során gyűjtött frakciókat egy HPLC pumpa által generált mozgófázissal jutattuk a készülékbe (mozgófázis: metanol-víz-hangyasav = 50-50-0,1 térfogatarányban; HPLC pumpa: Applied Biosystems 140C; áramlási sebesség 250 µl/perc; mintatérfogat: 5 µl).

Az elágazó láncú peptid analitikai adatai: m/z = 950,6 [M + H]<sup>+</sup>; m/z = 475,8 [M + 2H]<sup>2+</sup> és m/z = 317,5 [M + 3H]<sup>3+</sup>. A számolt monoizotópos tömeg: 949,6 Da.

A pentapeptid analitikai adatai: m/z = 625,2 [M + H]<sup>+</sup>; m/z = 312,9 [M + 2H]<sup>2+</sup> és m/z = 208,7 [M + 3H]<sup>3+</sup>. A számolt monoizotópos tömeg: 324,3 Da.

A dekaeptid analitikai adatai: m/z = 1190,8 [M + H]<sup>+</sup>; m/z = 595,7 [M + 2H]<sup>2+</sup> és m/z = 397,3 [M + 3H]<sup>3+</sup>. A számolt monoizotópos tömeg: 1189,5 Da.

A tizenkéttagú peptid analitikai adatai: m/z = 1484,9 [M + H]<sup>+</sup>; m/z = 742,7 [M + 2H]<sup>2+</sup> és m/z = 495,6 [M + 3H]<sup>3+</sup>. A számolt monoizotópos tömeg: 1483,8 Da

### 5.4. A pH-potenciometria

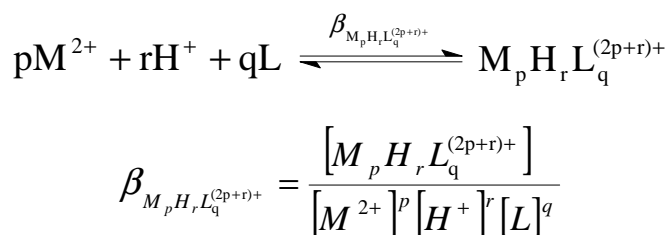
Az oldatbeli egyensúlyi vizsgálatok, a savi disszociációs ( $K_{\text{pqr}}$ ) és komplexképződési ( $\beta_{\text{pqr}}$ ) állandók meghatározása potenciometriás módszerrel történt. A módszer alkalmazhatóságának elvi háttere az, hogy a vizsgált folyamat során a fémionok leszorítják a ligandum protonjait. Ez az oldatbeli hidrogénion-koncentráció megváltozását okozza, mely az üvegelektrod által érzékelt potenciálváltozást eredményez. Az általunk tanulmányozott rendszerek mindegyike megfelel ennek a követelménynek. A pH-metriás titrálások nagyrészt vizes közegben, kisebb részt 80–20 % (v/v)-os dimetil-szulfoxid(DMSO)–víz elegyben történtek. A vizes közegű titrálásokat állandó hőmérsékleten (298,0 ± 0,1K) és állandó ionerősség (0,1 mol/dm<sup>3</sup>) mellett végeztük. Az ionerősség beállítására minden esetben analitikai tisztaságú NaCl-ot

vagy NaClO<sub>4</sub>-ot (Reanal) használtunk. A CO<sub>2</sub> és molekuláris oxigén távoltartására oldatainkba vagy azok fölé inert gázt, nagy tisztaságú argont buborékolattunk. A mérőoldat NaOH (Fluka) ~0,1 mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú vizes oldata volt, melyet ioncserélt, szűrt, desztillált és kiforralt vízből készítettünk. A mérőoldat koncentrációját pontos beméréssel készített kálium-hidrogénftalát (Fluka) oldat titrálásával határoztuk meg. A fémionok törzsoldatainak elkészítéséhez szilárd CuCl<sub>2</sub>-ot, ZnCl<sub>2</sub>-ot illetve NiCl<sub>2</sub>-ot (mindhárom Aldrich) használtunk fel, majd az oldatok koncentrációit komplexometriás titrálással határoztuk meg. A vizsgálatokhoz használt vegyszerek analitikai tisztaságú, kereskedelmi forgalomban kapható reagensek voltak az általunk előállított peptideken kívül.

A pH-potenciometriás titrálásokat IBM-kompatibilis PC által vezérelt Dosimat 665 típusú Metrohm automata bürettárból és Orion 710A precíziós pH-mérőből álló berendezéssel, illetve egy ABU93 típusú, beépített pH-mérővel rendelkező automata bürettával végeztük. Az Orion 9103 BN és Metrohm Micro (6.0234.100) kombinált pH üvegelektrod kalibrálásához erős savat (HCl vagy HClO<sub>4</sub>) titráltunk. Az így nyert  $E_{\text{rel.mV}}$  vs.  $V_{\text{ml}}$  adatsorok értékelése a módosított Nernst-egyenlet alapján történt [128]:

$$E = E_0 + K \cdot \log[H^+] + J_H \cdot [H^+] + \frac{J_{OH} \cdot K_w}{[H^+]},$$

melyben az ismert paraméterek mellett a  $J_H$  és  $J_{OH}$  az üvegelektrod savas illetve lúgos hibájának, valamint a folyadék–folyadék határfelületi potenciálból adódó hibáknak a korrekciójára szolgáló illesztési paraméterek, a  $K_w=10^{-13,75}$  M<sup>2</sup> pedig a víz autoprotolízis állandója [129]. A paraméterek kiszámítása a nemlineáris legkisebb négyzetek módszere szerint történt. A rendszerekben képződő részecskék az alábbi általános egyensúlyi folyamattal, ill. képződési állandóval jellemezhetők,



ahol M a fémiont, L a nemprotonált ligandum molekulát jelöli. A protonálódási és komplexképződési állandók ( $\beta_{M_p H_r L_q} = \beta_{pqr}$ ) meghatározását a PSEQUAD nevű számítógépes programmal végeztük [130]. Az említett állandók meghatározása 4-10 független titrálással történt, az egyes adatsorok egyenként 50-70 adatpontot tartalmaztak. A fém-ligandum arányt, rendszertől függően 1:2 és 2:1 között, míg a fémion-koncentrációt  $5 \times 10^{-4} - 5 \times 10^{-3}$  M tartomány-



ban változtattuk. (A továbbiakban egy adott komponens (pl.  $\text{Cu}^{2+}$ ) oldatbeli teljes koncentrációját a  $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}}$  szimbólum jelöli.)

A HSHRDFQPVLHL– $\text{NH}_2$  tizenkéttagú peptid savi disszociációs és komplexképződési állandóit cink(II)ionok jelenlétében 80-20 % (v/v)-os DMSO-víz elegyben is vizsgáltuk, állandó hőmérsékleten ( $298,0 \pm 0,1\text{K}$ ) és állandó ionerősség ( $0,1 \text{ mol/dm}^3$  KCl) mellett. Ilyen körülmények között az elektródot az Irwing-féle módszerrel kalibráltuk [131], a vízionszorzat értéke pedig  $K_w=10^{-18,40} \text{ M}^2$  [132,133]. A protonálódási és komplexképződési állandók kiszámolása szintén a PSEQUAD programmal történt a korábban ismertetett elvek szerint.

## 5.5. UV-látható spektrofotometria

Ahhoz, hogy a molekulák a fényt el tudják nyelni, az szükséges, hogy legyen két olyan belső állapotuk, amelyek energiájának  $\Delta E$  különbsége éppen megegyezik a fotonok  $h\nu$  energiájával. A feltétel teljesülése esetén az alacsonyabb energiájú állapotú molekula elnyelheti a fotont, így átkerülhet egy magasabb energiájú állapotba. A szabad atomok héjaiban a  $d$ -pályák degeneráltak. Az átmenetifém-komplexekben azonban – ahol a központi fémion közvetlen környezete már nem gömbszimmetrikus – a  $d$ -pályák egyenértékűsége megszűnik, s közöttük energia elnyelése közben elektronátmenetek jöhetnek létre. Az átmenetifém-ionok részlegesen betöltött  $d$ -pályái felelősek többek között a látható hullámhosszú fény abszorpciójáért. Az elektronátmenetek másik osztálya, a töltésátviteli (CT) sávok vizsgálata is fontos szerepet játszhat a komplexek szerkezetének felderítésében. Míg az előző esetben az elektronátmenet a fémes pályákon való átrendeződés eredménye, addig a töltésátviteli sávok a fémion és a ligandum közti elektron donor – elektron akceptor átmenetekkel jellemezhetőek. Ezen átmenetek eredményeként egyedi, nagy intenzitású (akár ezerszer nagyobb  $\epsilon$ , mint a  $d-d$  átmenetknél) abszorpciós sávok jelennek meg, főként az ultraibolya tartományban.

Az elektron-átmenetek gyakran összeolvadnak egyetlen sávzá, így az UV-látható spektrum folytonos szerkezetű. Energiájuk, illetve az intenzitásuk erősen függ attól, hogy a ligandumnak hány donoratoma koordinálódott a fémionhoz. Ezen kívül az abszorpciós maximum ( $\lambda_{\text{max}}$ ) értékeket befolyásolja a komplex pontos geometriája és a donoratomok kémiai minősége is. E tulajdonságok segítségével alkotott meg Billo [134] egy empirikus összefüggést a réz(II)komplexek várható abszorpciós maximumáról. Megállapította, hogy a hullám-szám ( $\text{v/cm}^{-1}$ ) értékekre jelentős hatásuk csak az ekvatoriális síkban koordinálódó donoratomoknak van, valamint, hogy az egyes donoratomokhoz rendelhető hatás additív. A lehetséges donorcsoportokat különböző típusokba sorolta, úgymint peptid amidnitrogén (azaz töltéssel rendelkező nitrogén donoratom), aminonitrogén, piridin/imidazolnitrogén, karboxilát oxigén,

karbonil oxigén, hidroxidion és víz. A donoratomok kémiai minőségének a hatását később Sigel és Martin [135], valamint Pettit és munkatársai [136] vizsgálták, már jóval nagyobb számú komplex spektroszkópiai adatainak a figyelembe vételével. Prenesti és munkatársai egy újabb munkában [137] tovább pontosították azt (5.5.1. táblázat). A vizes oldatban jelenlévő  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  ion négy ekvatoriális vízmolekulájának oxigén- vagy nitrogéndonorokra történő cseréje az abszorpciós maximumot a rövidebb hullámhosszak felé tolja el (kék eltolódás). Ez az effektus különösen nitrogéndonoroknál jelentős.

Donorcsoport	$\nu_i (\mu\text{m}^{-1})^a$		
	<i>Billo</i>	<i>Sigel és Martin</i>	<i>Prenesti</i>
aminonitrogén	0,453	0,460	0,450
peptidnitrogén	0,485	0,494	0,495
imidazolnitrogén	0,430	0,434	0,427
karboxiláttoxigén	0,342	0,346	0,353
hidroxidion	0,301	0,294	0,390
víz	0,301	0,294	0,296

$$^a \lambda_{\text{max}} = 10^3 / \sum_{i=1}^4 n_i \nu_i$$

**5.5.1. táblázat:** A réz(II)komplexek ekvatoriális síkjában koordinálódó donoratomok egyedi hozzájárulása az elméleti abszorpciós maximum ( $\lambda_{\text{max}}$ ) értékhez (vizes oldatban)

Ezzel szemben a ligandum axiális irányú koordinációja, a csak ekvatoriális síkban koordinált réz(II)komplexekre számolható elméleti abszorpciós maximumhoz képest a nagyobb hullámhosszak felé (vörös eltolódás) tolja el a  $\lambda_{\text{max}}$  értéket. A kvantitatív összefüggés megadását az nehezíti, hogy az effektus nagysága a donoratom kémiai természetén kívül függ a kelátgyűrű méretétől, valamint a ligandumhoz kapcsolódó, de a koordinációban részt nem vevő funkciós csoportoktól is [138].

A réz(II)–(His)<sub>4</sub>–(Lys)<sub>2</sub>–Lys–CONH<sub>2</sub> rendszerekben a pH-metriás titrálások minden pontjában *in situ* elnyelési spektrumokat vettünk fel egy Ocean Optics PC 2000 típusú üvegszál-optikás, diódasoros, bemerülőfejes spektrofotométer segítségével. A készülék a látható hullámhossz-tartományban (400–800 nm) működik. A többi rendszernél az elektrongerjesztési spektrumokat Hewlett Packard 8452A típusú diódasoros, Unicam Helios  $\alpha$ , illetve egy Varian Cary3E típusú spektrofotométeren vettük fel. A mérések során alkalmazott

réz(II)ion-koncentráció  $5 \times 10^{-4}$ – $3,1 \times 10^{-3}$  M volt. A spektrumokat 180–820 nm-es hullámhossz-tartományban vettük fel. A koncentrációtól és a vizsgált hullámhossz-tartománytól függően 1 és 2 cm-es úthosszal rendelkező kvarc küvettákat használtunk. A réz(II)- és nikkel(II)komplexek egyedi spektrumainak kiszámításához a korábban említett PSEQUAD programot alkalmaztuk [130].

## 5.6. CD-spektroszkópia

A síkban poláros fény felbontható egy jobbra és egy balra forgató komponensre. A fehérjék és peptidek, mint optikailag aktív anyagok, egy adott hullámhossz-tartományban a jobbra és balra forgató cirkulárisan poláros fényt eltérő mértékben nyelik el. Ezt a jelenséget nevezik cirkuláris dikroizmusnak vagy felfedezőjéről Cotton-effektusnak. A kétféle fénysugár (moláris) abszorpciójának különbségét ( $\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{bal}} - \epsilon_{\text{jobb}}$ ,  $\Delta A = A_{\text{bal}} - A_{\text{jobb}}$ ) vagy a mintából kilépő elliptikusan poláros fény ellipticitását ( $\Theta$ ) a hullámhossz ( $\lambda$ ) függvényében ábrázolva kapjuk meg a cirkuláris dikroizmus spektrumot. A CD görbe maximumai és minimumai az elektrongerjesztési abszorpciós spektrum maximuma helyén, illetve ahhoz közel jelentkeznek. Viszonylag keskeny sávok, ellentétben az elektrongerjesztési spektrummal.

A polipeptidek és fehérjék szerkezetvizsgálatában főként a CD spektrum ultraibolya tartománya informatív. Az amidkromofórok elnyelési hullámhossz-tartományában (180–250 nm) ezen csoportok egymáshoz képesti elrendeződésére, tehát az egyes másodlagos szerkezeti elemekre jellemző spektrumok mérhetők. A közeli UV tartomány (250–350 nm) a harmadlagos szerkezetről ad felvilágosítást. A cirkuláris dikroizmus spektroszkópiát a réz(II)- és nikkel(II)tartalmú peptidkomplexek szerkezetének vizsgálatára is széles körben használják. Az átmenetifém-komplexek kiralitását általában a következő aszimmetriaforrásoknak tulajdonítjuk:

- a fémion-donoratom együttesben fellépő királis elrendeződés,
- konfigurációs aszimmetria (a kelátgyűrűk királis elrendeződése a fémion körül),
- konformációs aszimmetria – az egyes kelátgyűrűk konformációjából adódó kiralitás (a gyűrűs kelát körüljárási iránya bizonyos helicitást mutat),
- a fémionhoz koordinálódott ligandumban található kiralitáscentrum hatásának közvetítése kémiai kötéseken keresztül.

Míg az első két lehetőség a kinetikailag inert komplexeknél fontos, addig a réz(II)- és nikkel(II)komplexek vizes oldataiban a c) és d) pontban felsorolt jelenségeknek van döntő szerepük. A ligandumban található kiralitáscentrumok egyrészt a kötéseken keresztül hatnak a fémionra, másrészt a kiralitáscentrum következtében fellépő aszimmetria miatt a kelátgyűrűk

valamely konformációja kitüntetett stabilitású lehet. Ennek hiányában ugyanis a konformáció szempontjából „racém elegy” alakul ki, melyekhez ellentétes előjelű, azonos nagyságú Cotton-effektus tartozik, amik így kioltják egymást. Az tehát, hogy a *d-d* átmenetek hullámhossztartományában optikai aktivitást tapasztalhatunk önmagában is egy királis ligandum koordinációját bizonyítja. A spektrum alakja, előjele és intenzitása pedig a fémion körül kialakult térbeli szerkezetre jellemző.

A HRG fragmensek távoli UV-CD spektrumait a dániai Institute for Storage Ring Facilities, University of Aarhus (ASTRID–ISA), szinkrotron sugárzásos (SRCD) berendezése segítségével rögzítettük. A részecskegyorsítóból a lineárisan polarizált fény egy  $\text{CaF}_2$ -os ablakon halad keresztül a CD készülékbe, folyamatos  $\text{N}_2$ -áram mellett, ahol a modulátor (PEM I/CF50, 50kHz) a polarizált fényt felváltva jobbra illetve balra cirkulárisan polarizált fénysugárrá átalakítja. A CD jelek rögzítésére a modulátorral szinkronizált fotoelektron sokszorozó detektort (PMT 9402B) használtunk. A készüléket a kámfor-szulfonsav spektruma alapján kalibráltuk. A spektrumokat 0,1 mm-es kvarc küvettában, 175–260 nm hullámhossztartományban rögzítettük vizes közegben, 298 K hőmérsékleten,  $1,0 \times 10^{-3}$  M ligandum koncentráció mellett.

A peptidkomplexek UV/látható CD spektumait Franciaországban egy Jasco J-710, illetve a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban egy Jobin-Yvon CD6 spektrométerekkel vettük fel vizes közegben, szobahőmérsékleten, 300–800 nm tartományban 1,0 cm optikai úthosszal mellett,  $5 \times 10^{-4}$ – $3,1 \times 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup> fémion koncentráció-tartományban. A réz(II)- és nikkel(II)komplexek egyedi spektrumainak kiszámításához ezúttal is a korábban már említett PSEQUAD programot használtuk.

## 5.7. ESR-spektroszkópia

Az elektronspin-rezonancia spektroszkópia (ESR) a párosítatlan elektront tartalmazó fémkomplexek szerkezeti jellemzésének az egyik leggyakrabban alkalmazott módszere. A módszer alapja a Zeemann effektus, melynek értelmében külső mágneses tér hatására a párosítatlan elektron energiaszintjének degenerációja megszűnik. A felhasadt energiaszintek között mikrohullámú sugárzás hatására átmenet jöhet létre.

Az ESR-aktív vegyületekben az alkalmazott mágneses tér mellett további – nullától eltérő magspinű mag(ok) vagy esetleg más párosítatlan elektron(ok) által indukált – elemi terek is hatással lehetnek az elektronnívók felhasadására, azaz módosíthatják a vonalak helyzetét (g), számát, alakját, illetve intenzitását. Az általunk tanulmányozott rendszerben az alábbi kölcsönhatásokkal kell számolnunk:

(a) Ha a párosítatlan elektron nem-zéró spinű mag ( $I \neq 0$ ) erőterében mozog, akkor a jel  $2I+1$  komponensre hasad fel. Ez a kölcsönhatás a hiperfinom csatolási állandóval ( $A$ ) jellemezhető. Többmagvú komplexek esetén a jel elvileg  $2nI+1$  vonalra hasadhat fel (ahol  $n$  a magok száma), azonban ezt az elektron-elektron kölcsönhatás elfedheti.

(b) A ligandum nem-zéró spinű magjai a spektrum további felhasadását eredményezhetik. Ezt az előbbinél gyengébb kölcsönhatást az okozza, hogy az elektron kismértékben ezen magok mágneses terét is érzékeli, így több mag hatása esetén  $2nI+1$  illetve különböző magok esetén  $(2n_1I_1+1) \times (2n_2I_2+1)$  további vonal jelenik meg a spektrumban. A kölcsönhatásokat a szuperhiperfinom csatolási állandó jellemzi ( $A$ ).

(c) Kétmagvú fémkomplexekben a centrumok közelsége elektronspin kicserélődést (antiferromágneses kölcsönhatást) eredményezhet a fémionok között. Ez a hatás erősen függ a fémionok egymástól való távolságától, s a kölcsönhatás jelentős sávkiszélesedést okozhat vagy akár az ESR-jel eltűnését is eredményezheti.

Az ESR-spektrumokat Budapesten (KKKI) Dr. Rockenbauer Antal, Dr. Korecz László és Dr. Nagy Nóra segítségével egy BRUKER EleXsys E500 típusú spektrométeren vettük fel, 100 kHz térmodulációval, 298 és 77 K hőmérsékleten. A méréseknél alkalmazott réz(II)-koncentráció  $1,1\text{--}2,3 \times 10^{-3}$  M volt. A spektrumokat a potenciometriás mérések alapján készített eloszlásgörbék alapján előre meghatározott pH-kon vettük fel. A mérések során kétféle módszert alkalmaztunk. A szobahőmérsékleten történő méréseket egy  $8\text{ cm}^3$  térfogatú átfolyós küvetában vizes közegben, állandó inert nitrogén gáz buborékoltatása közben, állandó ionerősség (0,1 M) mellett végeztük. Az ionerősség beállítására minden esetben analitikai tisztaságú NaCl-ot (Reanal) használtunk. A 298 K-en rögzített kifelbontású izotróp spektrumokat csak annak érdekében elemeztük, hogy nyomon követhessük a pH függvényében eltérő mértékben képződő ESR-aktív részecskék koncentrációjának változását. Az anizotróp spektrumok felvétele előtt a fagyasztott mintákhoz a jég szerkezetének megtörése céljából 30 % metanolt adtunk. Rendszerint egyidejűleg többféle komplex van jelen egy oldatban, és ezek spektrumai átfedik egymást, ezért az egyes molekulafajták szerkezeti jellemzése érdekében fel kell bontani a mért görbéket a rendszerben képződő komponensek színeképeire. Komponens spektrum alatt egy adott koordinációs környezethez tartozó spektrumot értünk. Az ESR-paraméterek ( $g_{\parallel}$ ,  $g_{\perp}$ ,  $A_{\parallel}$ ,  $A_{\perp}$  réz csatolások,  $a_N$  izotróp nitrogén csatolás) kiszámításához a Dr. Rockenbauer Antal által írt programot használtuk [139], mellyel egy mért spektrum legfeljebb három szimulált komponens spektrumra bontható fel. A mágneses tér hitelesítésére man-

gán(II)ionnal szennyezett MgO por szolgált. A részecskék spektrumának kiszámolásakor figyelembe vettük a réz természetes izotóp eloszlását.

## 5.8. NMR-spektroszkópia

A magmágneses-rezonancia spektroszkópia (NMR) alapja, hogy – hasonlóan az elektronokhoz – az atommagoknak is van impulzusmomentuma, s ezzel mágneses momentuma. A mágneses momentum (a spin), ha mágneses térbe kerül, beáll a tér irányába. Pontosabban kvantáltsága azt jelenti, hogy a külső térrel olyan szöget zár be, hogy vetülete meghatározott nagyságú legyen,  $\gamma\hbar$  egész vagy fél-egész számú többszöröse:  $m\gamma\hbar$ , ahol  $\hbar = h/2\pi$ ;  $\gamma$  az ún. giromágneses tényező (az egyes atommagokra jellemző állandó);  $m$  futó szám (maximuma  $I$ , a spin kvantumszám és nagysága az  $I, I-1, \dots, -I$ , összesen  $2I+1$  értéket veheti fel). Ha a mágnesmomentumot vektornak tekintjük, akkor a rezonancia azt jelenti, hogy a vektor az egyik lehetséges beállásból átbillen a másikba, vagyis a mag mágneses momentumának a külső mágneses térhez viszonyított iránya változik meg. Az ehhez szükséges energia rádiófrekvenciás sugárzás elnyeléséből származik és a megfelelő frekvenciát, amely a külső térrel arányos, szelektíven, rezonanciaszerűen nyelik el az egyes atommagok. A kémiai környezet befolyása (a külső mágneses tér milliomod részével, ppm-ben mérhetően) a rezonanciafrekvenciára a *kémiai eltolódás* ( $\delta$ ). Ha a kémiai környezet hat a rezonanciafrekvenciára, akkor az utóbbi pontos mértéke informál a kémiai szerkezetről. A jelek intenzitása arányos az értük felelős magok számával, vagyis az NMR-spektrumból megkapható a különböző kémiai környezetben előforduló azonos fajta magok relatív száma is. A spinekre hat szomszédaik kvantumállapota, azaz a szomszéd alap- vagy gerjesztett állapota eltérően hat a partnere körüli lokális mágneses tér nagyságára, s ezzel a rezonanciafrekvenciára. Tehát a jól elkülönülő jelek száma és intenzitásaránya a kémiai eltolódás-konceptciónak megfelelő, de egyes jelek egymáshoz közeli vonalakra hasadva multiplétként jelentkeznak. A vonaltávolságot hívjuk csatolási állandónak ( $J$ ), amely rendkívül érzékeny a csatoló spin kölcsönös térbeli helyzetére, így a csatolási állandó kulcsinformáció a molekulák háromdimenziós szerkezetét illetően.

Az NMR-mérések során lehetőség van arra, hogy a különböző csoportok rezonanciajelei között mágnesezettség transzfert hozunk létre és a kapott spektrumot két tengelyen ábrázoljuk. Ez a módszer a kétdimenziós NMR-spektroszkópia, ami megkönnyíti a bonyolult elsőrendű spektrumok kiértékelését. Segítségével azonosíthatók sok esetben a ligandum donor-csoportjai és hasznos szerkezeti információkat is nyerhetünk. A kétdimenziós NMR-spektroszkópiának többféle technikai kivitelezése van. A COSY (korrelációs spektroszkópia) homonukleáris szomszédos magok, a TOCSY az egy spinrendszerhez tartozó homonukleáris

magok kölcsönhatását érzékeli kötésen keresztüli (skaláris) csatolás révén. Az egymással csatoló magok ún. keresztcsúcsot adnak a spektrumban. A ROESY a NOESY (mag Overhauser hatás spektroszkópia) forgó koordináta-rendszerű változata. A mag Overhauser hatást (NOE) a magok (mágneses dipólok) közvetlen dipoláris csatolása miatt fellépő ún. keresztrelaxációs folyamatok okozzák. Ez azt jelenti, hogy a csatolás nem kötésen keresztül, hanem téren keresztül jön létre, tehát a molekula térbeli elrendeződéséről kapunk információt. A hatás kb. 0,5 nm távolságig terjed ki.

A réz(II)komplexeknél a réz(II)ion paramágneses tulajdonsága miatt az NMR-spektroszkópia korlátozottan alkalmazható. Jóval nagyobb a jelentősége ugyanakkor a cink(II)komplexek vizsgálatában, mert az egyes atomcsoportokra (az általunk is alkalmazott  $^1\text{H}$ -NMR-spektroszkópia esetén a hidrogént tartalmazó csoportokra) jellemző jelek kiszélesedéséből és kémiai eltolódás értékéből, valamint a jelek felhasadásából következtethetünk a ligandum különböző csoportjainak protonáltságára, illetve fémionhoz való koordinálódására.

Az NMR-mérések a Szegedi Tudományegyetemen Bruker Avance DRX 400 és Bruker Ultrashield 500 Plus, valamint a Nancy-i Egyetem Bruker Avance 500 típusú spektrométerein történtek. A spektrumokat vízben, deutérium-oxidban és deuterált dimetil-szulfidban vettük föl 298 K-en, állandó ionerősség (0,1 M NaCl) mellett. A fémion-koncentráció  $4,7 \times 10^{-3}$ – $1,0 \times 10^{-2}$  M között változott. A deuterált oldatokban az előre meghatározott pH\* (a leolvasott, deutérium hatással nem korrigált pH) értékeket NaOD oldattal állítottuk be. A kémiai eltolódás értékeket ( $\delta$ ) dioxán belső referens alkalmazásával,  $\text{Me}_4\text{Si}$ -ra vonatkoztatva adtuk meg (3,700 ppm  $^1\text{H}$ -NMR). A felvett 2D COSY, TOCSY és ROESY spektrumok 2048(F2)  $\times$  1024(F1) komplex pontot tartalmaztak. Az NMR-spektrumokat a Topspin 2.0 programcsomag (Bruker) segítségével értékeltük ki. Valamennyi ligandum esetén készült  $^1\text{H}$ -NMR-spektrum egyrészt a ligandum azonosítása, másrészt tisztaságának ellenőrzése céljából.

#### A vizsgált peptidek NMR-jeleinek hozzárendelése:

(m = multiplet, t = triplet, d = dublet, dd = dublet dubletja, s = szinglet)

Az *Ac-HHPHG-NH<sub>2</sub>*  $^1\text{H}$ -NMR-jelei  $\text{D}_2\text{O}$ -ban, pH\* = 7,9 és  $\delta$  ppm-ben:  $\delta$  = 1,71-1,82 és 2,10-2,21 (m és m, 1 H és 1 H Pro  $\beta\text{-CH}_2$ ); 1,81-1,91 (m, 2 H Pro  $\gamma\text{-CH}_2$ ); 1,91 (s, 3 H acetyl  $\text{CH}_3\text{-CO-}$ ); 2,82-3,10 (m, 3  $\times$  2 H His  $\beta\text{-CH}_2$ ); 3,35-3,44 és 3,51-3,60 (m és m, 1 H és 1 H Pro  $\delta\text{-CH}_2$ ); 3,79 és 3,85 (AB kvartet, 1 H és 1 H Gly  $\alpha\text{-CH}_2$ ); 4,29-4,34 (dd, 1 H Pro  $\alpha\text{-CH}$ );

4,45-4,58 és ~ 4,77 (m és ? (átfed a víz jelével), 2×1 H és 1 H His α-CH); 6,82, 6,89 és 6,93 (3×s, 3×1 H His C<sup>5</sup>H); 7,62, 7,64 és 7,66 (3×s, 3×1 H His C<sup>2</sup>H).

Az **Ac-HHPHGHHHPHG-NH<sub>2</sub>** <sup>1</sup>H-NMR-jelei D<sub>2</sub>O-ban, pH\* = 5,87 és δ ppm-ben: δ = 1,73-1,82 és 2,14-2,23 (m és m, 2×1 H és 2×1 H Pro β-CH<sub>2</sub>); 1,84-1,92 (m, 2×2 H Pro γ-CH<sub>2</sub>); 1,90 (s, 3 H acetyl CH<sub>3</sub>-CO); 2,92-3,25 (m, 6×2 H His β-CH<sub>2</sub>); 3,43-3,60 (m, 2×2 H Pro δ-CH<sub>2</sub>); 3,80-3,91 (m, 2×2 H Gly α-CH<sub>2</sub>); 4,31-4,37 (m, 2×1 H Pro α-CH); 4,50-4,67 és 4,82-4,90 (m és m, 4×1 H és 2×1 H His α-CH); 7,04, 7,08, 7,11, 7,12, 7,19 és 7,20 (6×s, 6×1 H His C<sup>5</sup>H); 8,16, 8,24, 8,24, 8,26, 8,28 és 8,33 (6×s, 6×1 H His C<sup>2</sup>H).

A **HSHRDFQPVLHL-NH<sub>2</sub>** <sup>1</sup>H-NMR-jelei D<sub>2</sub>O-ban, pH\* = 5,0 és δ ppm-ben: δ = 0,75–0,95 (m, 6×3 H Val,Leu –CH<sub>3</sub>); 1,30-1,75 (m, 2×2 H Arg γ,δ –CH<sub>2</sub>; 2×2 H Leu β-CH<sub>2</sub>, 2×1 H γ-CH); 1,75-2,00 (m, 1 H Val β-CH, 1 H Pro γ-CH); 2,15-2,30 (m, 2 H Pro β-CH<sub>2</sub>); 2,40-2,65 (m, 2 H Asp β-CH<sub>2</sub>); 2,90-3,30 (m, 5×2 H Phe, Arg, His β-CH<sub>2</sub>); 3,50-3,60 (m, 2 H Pro δ-CH<sub>2</sub>); 3,75-3,87 (m, 2 H Ser β-CH<sub>2</sub>); 3,90-4,00 (d, 1 H Val α-CH); 4,20-4,35 (m, 5×1 H His, Leu, Pro α-CH); 4,44-4,49 (t, 1 H Ser α-CH); 4,49-4,57 (m, 2×1 H Arg, Phe α-CH); 7,13-7,20 and 7,25-7,31 (m, 5 H Phe Ar-CH); 7,20-7,25 (s, 3×1 H His C<sup>5</sup>H); 8,20-7,55 (s, 3×1 H His C<sup>2</sup>H).

A **HCDLPCG-NH<sub>2</sub>** <sup>1</sup>H-NMR-jelei D<sub>2</sub>O-ban, pH\* = 9,0 és δ ppm-ben: δ = 0,80–0,90 (m, 3 H Leu –CH<sub>3</sub>); 1,50-1,65 (m, 3 H Leu α-CH, β-CH<sub>2</sub>); 1,85-1,95 (m, 1 H Pro β-CH<sub>2</sub>); 1,95-2,05 (m, 2 H Pro γ-CH<sub>2</sub>); 2,20-2,30 (m, 1 H Pro β-CH<sub>2</sub>); 2,45-2,70 (m, 2 H Asp β-CH<sub>2</sub>); 2,70-2,80 (m, 2 H Cys<sup>a</sup> β-CH<sub>2</sub>); 2,80-2,95 (m, 4 H His, Cys<sup>b</sup> β-CH<sub>2</sub>); 3,60-3,63 (m, 1 H Pro δ-CH<sub>2</sub>); 3,70-3,75 (t, 1 H His α-CH); 3,75-3,85 (m, 1 H Pro δ-CH<sub>2</sub>); 3,85-3,97 (AB kvartett, 2 H Gly α-CH); 4,3-4,35 (m, 2 H Cys<sup>a/b</sup> α-CH); 4,35-4,40 (m, 1 H Pro α-CH); 4,57-4,63 (m, 2 H Leu, Asp α-CH); 6,89 (s, 1 H His C<sup>5</sup>H); 7,66 (s, 1 H His C<sup>2</sup>H)

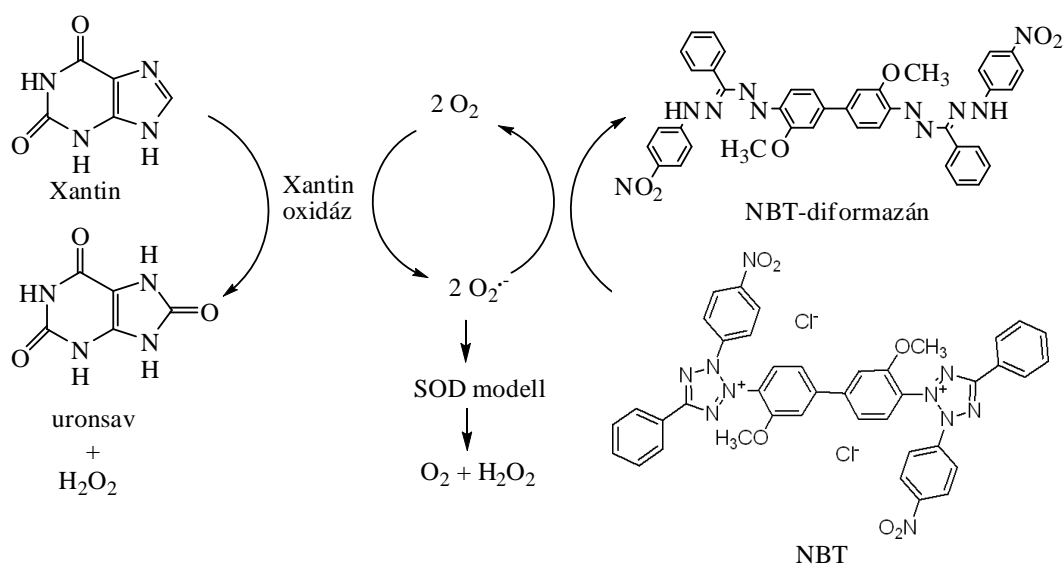
A **(His)<sub>4</sub>-(Lys)<sub>2</sub>-Lys-CONH<sub>2</sub>** <sup>1</sup>H-NMR-jelei 10% D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O-ban, pH\* = 7,0 és δ ppm-ben: δ = 1,24-1,39 (3×2 H Lys γ-CH<sub>2</sub>); 1,38-1,51 (3×2 H Lys δ-CH<sub>2</sub>); 1,69-1,73 (3×2 H Lys β-CH<sub>2</sub>); 3,12-3,18 (3×2 H Lys ε-CH<sub>2</sub>); 3,31-3,35 (4×2 H His β-CH<sub>2</sub>); 4,18-4,20 (3×1 H Lys α-CH); 4,13-4,69 (4×1 H His α-CH); 7,36 (4×1 H His C<sup>5</sup>H); 8,65 (4×1 H His C<sup>2</sup>H)



## 5.9. Szuperoxid-dizmutáz aktivitás mérése

Az vizsgált komplexek szuperoxid dizmutáz aktivitását 298 K-en a McCord-Fridovich-féle indirekt tesztreakcióval vizsgáltuk [140,141]. A szuperoxid-gyököt a xantin/xantin oxidáz reakció segítségével *in situ* állítottuk elő. Az oldatban adott nitroblue-tetrazolium-klorid só (NBT, Sigma) szuperoxiddal történő redukciója diformazán képződését eredményezi, melynek jellemző kékeslila színe 560 nm-nél intenzív fényelnyelést mutat (5.9.1. ábra). A szuperoxid-koncentrációt csökkenteni képes fémkomplexek gátolják ezt a reakciót, s így jelenlétükben az 560 nm-en mért abszorbancia lassabban növekszik, mint az aktív fémkomplexet nem tartalmazó referencia rendszerben (vakminta).

Az abszorbancia változását 1 cm úthosszúságú műanyag küvettában, Unicam Helios  $\alpha$  forgócellás spektrofotométerrel követtük. A SOD-aktivitás mérése során foszfátpufferekben ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  és  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $c = 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ , Reanal) oldott  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$  koncentrációjú NBT és  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$  koncentrációjú xantin oldatot használtunk. A xantin oxidáz mennyiségét úgy állítottuk be, hogy az abszorbancia változás 560 nm-nél  $0,025\text{--}0,028 \text{ perc}^{-1}$  érték között változzon. Az NBT redukcióját változó koncentrációjú nikkel(II)–HCDLPCG- $\text{NH}_2$  komplex jelenlétében, illetve annak távollétében is vizsgáltuk, a teljes nikkel(II)koncentráció  $0\text{--}1,0 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$  között változott. Külön méréseket végeztünk 298 nm-en a húgysav (uronsav) képződésének ellenőrzésére, hogy a kísérletek során kiszűrjük a vizsgált komplexeknek magára a xantin/xantin-oxidáz rendszerre gyakorolt esetleges inhibícióját.



5.9.1. ábra: A SOD-aktivitás méréséhez használt modellreakció

A SOD-aktivitást az irodalomban elfogadott gyakorlatnak megfelelően az  $IC_{50}$  értékkel jellemeztük. Ez azt a komplexkoncentrációt jelenti, ahol a diformazán képződése a komplex távollétében mért érték 50%-ára csökken. Egy állandó pH-értéknél elvégzett mérésorozat megjelenítésekor a % inhibíció értékeket ábrázoljuk a minta teljes  $Ni^{2+}$ -koncentrációjának függvényében, s az 50 %-os inhibícióhoz tartozó fémion-koncentrációt meghatározva jutunk az  $IC_{50}$  értékhez. Minél kisebb tehát az  $IC_{50}$  érték, annál jobb működési SOD-modell az adott komplex. A % inhibícióra vonatkozó formula az alábbiak szerint adható meg:

$$\% \text{ inhibíció} = \frac{\left(\frac{\Delta A}{\text{perc}}\right)^{vak} - \left(\frac{\Delta A}{\text{perc}}\right)^{komplex}}{\left(\frac{\Delta A}{\text{perc}}\right)^{vak}} \times 100$$

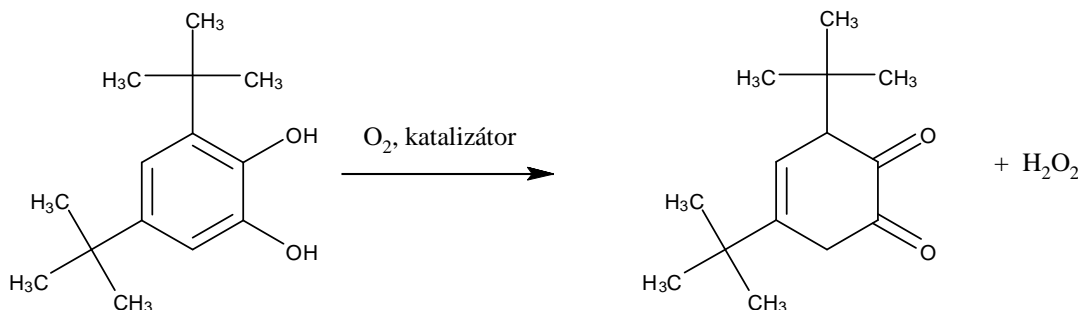
Az irodalomban aktivitási egységgel (U) is szokás jellemezni a SOD-aktivitást, mely az NBT redukciójának 50%-os csökkenéséhez szükséges inhibitor anyagmennyiségének a reciproka (adott térfogatban), mértékegysége  $1/\mu\text{mol}$ :

$$U = \frac{2 \times \left( \left(\frac{\Delta A}{\text{perc}}\right)^{vak} - \left(\frac{\Delta A}{\text{perc}}\right)^{komplex} \right)}{\left(\frac{\Delta A}{\text{perc}}\right)^{vak} \times n_{komplex}}$$

## 5.10. Pirokatechin-oxidáz aktivitás mérése

A pirokatechin-oxidáz enzimek *orto*-fenol származékok kinonná történő átalakulását katalizálják. Az elágazó láncú peptid réz(II)komplexeinek oxidáz sajátosságát a 3,5-ditercbutil-pirokatechin ( $H_2dtbc$ ) oxidációján keresztül mértük. Az enzimmodellek oxidatív tulajdonságának jellemzéséhez gyakran használt modellreakció során a dtbq 3,5-ditercbutil-*o*-kinonná (dtbq) oxidálódik (5.10.1. ábra). A termék intenzív sárga színű, így a folyamat spektrofotometrián, 400 nm hullámhosszon ( $\epsilon_{400} = 1900 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ) jól követhető. A kinetikai méréseket a termék rossz vízzoldhatósága miatt 44 % (m/m) etanol-víz elegyben végeztük. Az állandó kiindulási oxigénkoncentrációt az etanol  $O_2$ -gázzal történő folyamatos telítésével biztosítottuk. A reakcióelegyek pH-ját biológiai pufferekkel (MES, CHES, HEPES, CAPS) állítottuk be és standard pufferekkel kalibrált (pH = 4,0; 7,0 és 10,0) kombinált üvegelektóddal határoztuk meg. A reakcióelegyben a pufferkoncentráció  $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$  volt. Az etanol-

víz elegyben az üvegelektrod potenciálja megváltozik, így eseünkben az aktuális pH úgy számolható ki, hogy a leolvasott értékhez hozzáadunk 0,154 egységet [142]. Mivel az egyensúlyi rendszer viselkedése is megváltozik, s a részecske eloszlást 44 %(m/m) etanol-víz elegyben nem vizsgáltuk, ezért a kinetikai görbéken a pH mérőről leolvasott értéket tüntettük fel.



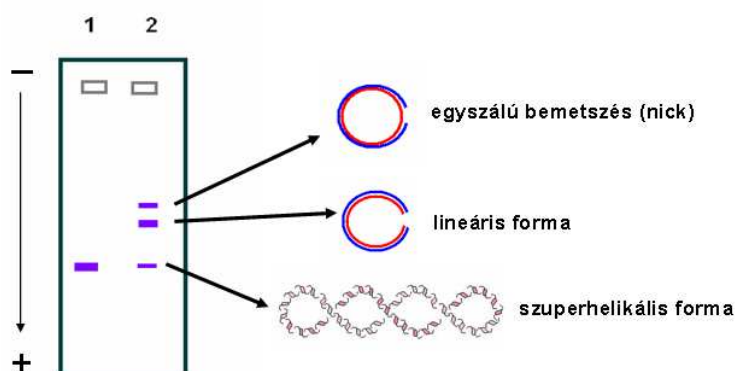
**5.10. 1. ábra:** A 3,5-ditercbutil-pirokatechin oxidációja 3,5-ditercbutil-ortokinonná

A reakcióelegyben az ionerősség  $0,1 \text{ mol/dm}^3$  értékét a pufferek mellett NaCl-oldattal állítottuk be, az állandó 298 K hőmérsékletet termosztálással biztosítottuk. A számolt kinetikai adatokat minden esetben korrigáltuk a katalizátort nem tartalmazó oldatokban mért autooxidációval, vagyis a 3,5-ditercbutil-pirokatechin autooxidációját minden mért szubsztrát koncentrációnál külön meghatároztuk, és ennek értékét levontuk a komplex által katalizált reakció sebességéből. A  $k = \Delta c_{\text{dtbq}} / (\Delta t \times c)$  sebességi állandót kezdeti sebességek módszerével számoltuk ki. Az oxidációs folyamatot Unicam Helios  $\alpha$  spektrofotométer segítségével követtük 1 cm úthosszúságú küvettában.

### 5.11. DNS hidrolízisének vizsgálata

Mivel munkánk egyik célja nukleáz enzimek funkcionális modelljeinek kialakítása volt, ezért vizsgáltuk, hogy az elágazó láncú peptid fémkomplexei képesek-e elősegíteni a DNS, mint természetes makromolekuláris szubsztrát hidrolízisét. Ennek legegyszerűbb módja a cirkuláris DNS átalakulásainak a követése agaróz gélelektroforézis segítségével. A plazmid méretű DNS molekulák elválasztására általában az 1%-os gél nyújt lehetőséget. A cirkuláris DNS alapállapotban kompakt, úgynevezett szuperhelikális (I-es forma) szerkezetet vesz fel. Amikor ezt a DNS-t olyan komplexszel inkubáljuk, amely a megfelelő körülmények (pH, T, I) között hidrolitikus aktivitást fejt ki, de csak a kettős szál egyikén képes ún. egyszálú bemetszéseket (nick) létrehozni, akkor a szuperhelikális forma kitekередik és a DNS nyílt cirkuláris (II-es) formát vesz fel. Amennyiben a komplex kétszálú hasításra képes, vagy a véletlenszerű bemetszések a két szálon egymáshoz kellő közelségben történnek meg, akkor kialakulhat a

DNS nyíltláncú formája (lineáris vagy III-as forma) is (5.11.1. ábra). A DNS felsorolt formáinak bár a bázispárok számát tekintve mérete azonos, de az alaki változás miatt agarózgélben történő elektroforézis során a vándorlási sebességük mégis más-más lesz. A nyílt cirkuláris DNS lassabban vándorol a gélben, mint a tömörebb szuperhelikális DNS molekulák. A lineáris forma a körülményektől függően az I-es forma előtt vagy mögött fut, esetünkben a megjelenését nem tapasztaltuk a gélen. A három forma relatív mobilitása függ az agarózgél koncentrációjától, az alkalmazott áramerősségtől, a futtatáshoz használt puffer ionerősségétől és a szuperhelikális forma másodlagos szerkezetétől.



**5.11.1. ábra:** A cirkuláris DNS különböző formáinak követése agaróz gélelektroforézis segítségével: az 1-es zsebben egy natív szuperhelikális DNS sávja látható, a 2-es zsebben a hidrolízis eredményeként megjelenő nyílt cirkuláris (nick vagy II-es forma) és a lineáris DNS (III-as forma) is látható

A kísérlet-sorozatainkban az MTA-SZBK Biokémiai Intézetben előállított és Sigma MIDI Kit (GenElute HP Plasmid Perciprep Kit) segítségével megtisztított pUC18 DNS-t használtunk. Az agarózgélbe (SeaKem) minden esetben olyan „mintakoktét” pipettáztunk, amely 1-2  $\mu\text{l}$  DNS-t, 2-8  $\mu\text{l}$  komplexet ( $c = 2,0 \times 10^{-4} - 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ ) és 12-19  $\mu\text{l}$  0,1-0,5  $\text{mol/dm}^3$  puffert (MES, HEPES, TRIS) tartalmazott. A hasítást pH 6,5-8,5 között vizsgáltuk, a végső térfogat 20-22  $\mu\text{l}$  volt. A reakcióelegyet  $37^\circ\text{C}$  hőmérsékleten inkubáltuk 20 órán át. A futtatáshoz 3  $\mu\text{l}$  brómfenolkék mintafelvívő festéket (0,1% brómfenolkék, 0,2  $\text{mol/dm}^3$  EDTA, 50% glicerin) használtunk minden minta esetében, mely TBE pufferben (0,05  $\text{mol/dm}^3$  TRIS, 0,05  $\text{mol/dm}^3$  bórsav, 0,001  $\text{mol/dm}^3$  EDTA, pH = 8,0) történt, 3-4 órán át, 80 V feszültséget használva. A futtatást követően a gél 20-30 percen keresztül etídium-bromid oldatban áztattuk (Sigma), amelynek az oldatbeli végső koncentrációja 0,5  $\mu\text{g/ml}$  volt. A DNS molekulához kötődő reagens UV-fény hatására fluoreszkál, így a DNS sávok láthatóvá tehetőek.

## 6. Kísérleti eredmények és értékelésük

### 6.1. A hisztidingazdag glikoprotein hisztidingazdag tartományából származtatott peptidek fémkötő tulajdonságainak vizsgálata

#### 6.1.1. Az Ac-HHPHG-NH<sub>2</sub> (HP1) és Ac-HHPHGHPHG-NH<sub>2</sub> (HP2) peptidek protonálódási viszonyai

A peptid–fémion rendszerek vizsgálata előtt a ligandumok sav-bázis egyensúlyait tanulmányoztuk. A potenciometriás titrálási görbék szerint a **HP1** és **HP2** peptidek hisztidin imidazolcsoportjai átfedő deprotonálódási folyamatok során adják le három, ill. hat protonjukat. A meghatározott  $pK$  értékek (6.1.1. táblázat) nagyon hasonlóak a végükön védett, rövid, hisztidingazdag peptidekéhez [11,19-23,28,143], ami azt tükrözi, hogy a ligandumok deprotonálódott csoportjai között nincs specifikus kölcsönhatás. Mivel a  $pK$  értékek makroszkópikus állandók, nem lehet egyedi hisztidin egységekhez rendelni őket.

$H_qL_r$	HP1		HP2	
	$\log\beta_{pqr}$	$pK_{pqr}$	$\log\beta_{pqr}$	$pK_{pqr}$
$[H_6L]^{6+}$	–	–	37,05(1)	5,14
$[H_5L]^{5+}$	–	–	31,91(1)	5,61
$[H_4L]^{4+}$	–	–	26,30(1)	5,92
$[H_3L]^{3+}$	18,78(1)	5,60	20,38(1)	6,43
$[H_2L]^{2+}$	13,18(1)	6,24	13,95(1)	6,63
$[HL]^+$	6,94(1)	6,94	7,32(1)	7,32

**6.1.1. táblázat:** A HP1 és HP2 protonkomplexek bruttó stabilitási állandóinak logaritmusai ( $\log\beta_{pqr}$ ) és  $pK_{pqr}$  értékei ( $p = 0$ ) vizes közegben ( $T=298\text{ K}$ ,  $I=0,1\text{ M NaCl}$ ). A zárójelben az utolsó értékes jegy hibája látható

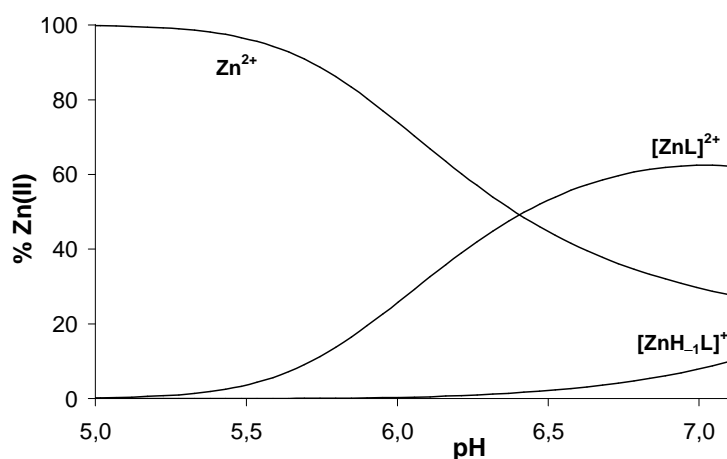
#### 6.1.2. A HP1 és HP2 peptidek kölcsönhatása cink(II)ionokkal

A cink(II)–**HP1** és cink(II)–**HP2** rendszerekben lejátszódó komplexképződési egyensúlyi folyamatokat pH-potenciometriás titrálások, NMR- és SRCD-vizsgálatok segítségével követtük nyomon. A pH-metriás adatok kiértékelése során számolt bruttó stabilitási állandókat és néhány származtatott értéket a 6.1.2. táblázat foglalja össze. A  $[ZnL]^{2+}$  törzskomplex kialakulását eredményező komplexképződési folyamatok  $pH \sim 5$  fölött kezdődnek el a cinket és **HP1** peptidet 1:1 valamint 2:1 arányban tartalmazó oldatokban. Ez az egyetlen nagyobb mennyiségben képződő részecske az ekvimoláris oldatban (6.1.1 ábra).

$M_pH_qL_r$	HP1		HP2	
	$\log\beta_{pqr}$	$pK_{pqr}$	$\log\beta_{pqr}$	$pK_{pqr}$
$[ZnH_4L]^{6+}$	–	–	29,1(1)	4,8
$[ZnH_3L]^{5+}$	–	–	24,26(5)	5,71
$[ZnH_2L]^{4+}$	–	–	18,55(7)	5,80
$[ZnHL]^{3+}$	–	–	12,75(3)	6,45
$[ZnL]^{2+}$	4,16(2)	7,89	6,30(3)	7,96
$[ZnH_{-1}L]^+$	–3,7(2)	–	–1,66(9)	–
$[Zn_2L]^{4+}$	–	–	10,23(3)	–

**6.1.2. táblázat:** A cink(II)komplexek bruttó stabilitási állandóinak logaritmusai ( $\log\beta_{pqr}$ ) és a származtatott  $pK_{pqr}$  értékek vízben (T=298 K, I=0,1 M NaCl). A zárójelben az utolsó értékes jegy hibája látható

Stabilitási állandója ( $\log K = 4,16$ ) számottevően nagyobb, mint az Ac-HHVGDNH<sub>2</sub> [28] vagy az Ac-HPHOEt [143] {2N<sub>im</sub>} koordinált komplexeinek állandója, ami azt sugallja, hogy mindhárom hisztidin koordinálódik benne. Az Ac-HPHPPH-NH<sub>2</sub> és az Ac-HHGH-NHMe peptidek törzskomplexeivel [23,28] összevetve, a fenti  $\log K$  érték kb. egy logaritmikus egységgel kisebb, míg az Ac-HPHH-NH<sub>2</sub> peptid ZnL komplexének stabilitásával [19] jó közelítéssel megegyezik. Valószínűnek tűnik, hogy az ilyen rövid peptidekben a prolin feszült szerkezetet hoz létre, és a {3N<sub>im</sub>} típusú koordináció stabilitását csökkenti, amennyiben két hisztidin szomszédos helyzetben van.

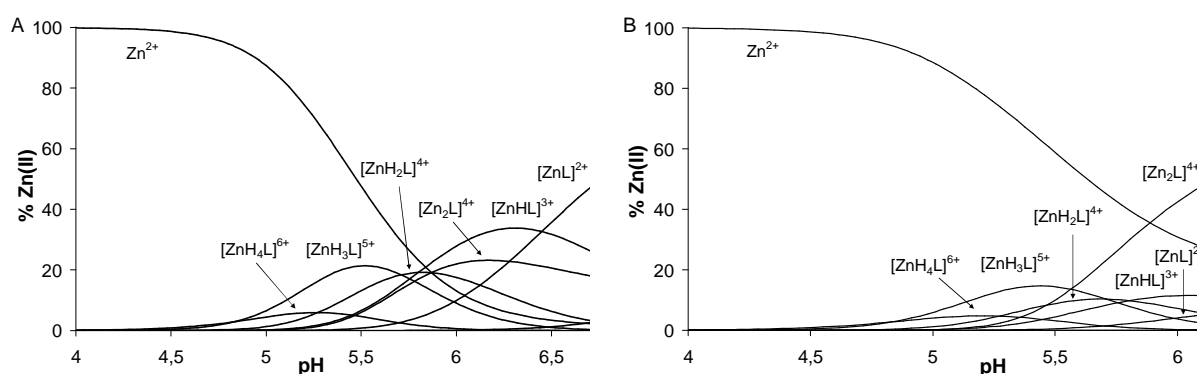


**6.1.1. ábra:** A cink(II)–HP1 rendszer részecskeeloszlási diagramja

$$([Zn^{2+}]_{tot} = [HP1]_{tot} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ M, T=298 K, I=0,1 M NaCl})$$

A titrálásokat pH ~ 7,1-ig tudtuk nyomon követni, mert előlött csapadék jelent meg oldatainkban a  $[\text{ZnLH}_1]^-$  részecske képződésével párhuzamosan. Hasonló jelenséget már számos N-terminálisán védett oligopeptid–cink(II) rendszerben megfigyeltek [11,18,19,22,23,28].

A csapadékképződés a cink(II)–**HP2** rendszerrel végzett kísérleteinket is korlátozta. Itt 1:1 aránynál pH ~ 6,7-ig, fémionfelesleg esetén pH ~ 6,1-ig tudtunk mérni. Az eltérő mértékben protonált egymagvú komplexek mellett a kétmagvú  $\text{Zn}_2\text{L}$  részecske is jelentős mennyiségben kimutatható volt, még ekvimoláris összetételnél is (6.1.2.A ábra).

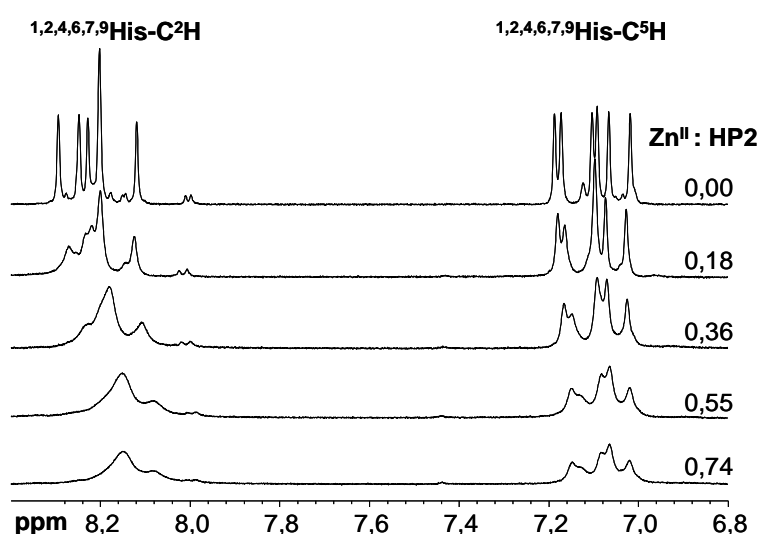


**6.1.2. ábra:** A cink(II)–**HP2** rendszer 1:1 arányú (A) és 2:1 arányú (B) részecskeeloszlási diagramja  
 $([\text{HP2}]_{\text{tot}} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ M}, T = 298 \text{ K}, I = 0,1 \text{ M NaCl})$

A  $\text{Zn}^{2+} + [\text{H}_3\text{L}]^{3+} = [\text{ZnH}_3\text{L}]^{5+}$  folyamatra számolt stabilitási állandó ( $\log K_{[\text{ZnH}_3\text{L}]^{5+}} \sim 3,9$ )  $\{3\text{N}_{\text{im}}\}$  típusú koordinációra utal a **HP2** cink(II)komplexében. Fontos megjegyezni, hogy a hat hisztidin alegység számos lehetőséget kínál a  $\{3\text{N}_{\text{im}}\}$  kötési mód kialakításához, így igen valószínű, hogy a  $[\text{ZnH}_3\text{L}]^{5+}$  összetétel koordinációs izomereket takar. Bár a  $[\text{ZnH}_2\text{L}]^{4+}$ ,  $[\text{ZnHL}]^{3+}$  és  $[\text{ZnL}]^{2+}$  részecskék képződéséhez vezető  $pK$  értékek ( $pK = 5,71$  és  $5,80$  és  $6,45$ ) szignifikánsan kisebbek, mint a szabad ligandum utolsó  $pK$ -ja ( $pK_{[\text{HL}]^+} = 7,32$ ), ez még nem bizonyítja az összes imidazol koordinációját a fémionhoz. Másrészt viszont a  $[\text{ZnL}]^{2+}$  törzskomplex kiemelkedő stabilitással bír ( $\log K = 6,30$ ) számos  $\{3\text{N}_{\text{im}}\}$  ( $\log K \sim 5,0$  [14,18,23,28]) – köztük a **HP1**  $[\text{ZnL}]^{2+}$  komplexe – vagy  $\{4\text{N}_{\text{im}}\}$  ( $\log K \sim 5,5$  [14,29]) koordinált cink(II)komplexhez képest, ami alapján a **HP2** legalább öt nitrogén donoratomjának fémionhoz való kötődése javasolható. A megnövekedett stabilitás egyértelműen rávilágít arra is, hogy a **HP1** és **HP2**  $[\text{ZnL}]^{2+}$  komplexében a fémionok környezete különböző. A ligandum nyújtotta nagyszámú kötőhely lehetőséget teremt cinkfelesleg esetén kétmagvú komplexek képződésére (6.1.2.B ábra). pH ~ 6-nál a  $[\text{Zn}_2\text{L}]^{4+}$  komplex az uralkodó részecske, ami összhangban van azzal a korábbi felismeréssel, hogy a natív HRG képes molekulánként kb. 10  $\text{Zn}^{2+}$  iont [70], azaz HRR ismétlődő egységekként egy-egy fémiont koordinálni. A közelmúlt-

ban publikált, végükön védett zebrahal prion protein fragmensek vizsgálata is rámutatott, hogy a hat, ill. hét hisztidint tartalmazó ligandumok hajlamosak kétmagvú cink(II)komplexeket kialakítani [29]. A  $[\text{ZnL}]^{2+} + \text{Zn}^{2+} = [\text{Zn}_2\text{L}]^{4+}$  folyamatra kiszámolt stabilitási állandó ( $\log K = 3,93$ )  $\{3\text{N}_{\text{im}}\}$  koordinációt sejtet a második fémion körül. Ezzel szemben a  $[\text{Zn}_2\text{L}]^{4+}$  részecske bruttó stabilitási állandója ( $\log \beta = 10,23$ ) figyelemre méltó extra stabilizációról ( $\Delta$ ) tanúskodik a **HP2** kétmagvú komplexében, összevetve a **HP1**  $[\text{ZnL}]^{2+}$  komplexével ( $\Delta = \log \beta_{\text{Zn}_2(\text{HP2})} - 2 \times \log \beta_{\text{Zn}(\text{HP1})} = 1,91$ ). A fentiekhez hasonlóan, a második cink(II)ion koordinálódásánál jelentkező kooperatív hatást figyelték meg a natív HRG [44,47] és prionszerű fehérjék hisztidingazdag peptid-fragmenseinek tanulmányozásakor [29]. A **HP2**-nél tapasztalt kooperatív hatás arra enged következtetni, hogy a kétmagvú  $\text{Zn}_2(\text{HP2})$  komplexben mindkét cink környezete eltér az öttagú **HP1** peptid  $[\text{ZnL}]^{2+}$  részecskéjében található fémközponttól.

Annak érdekében, hogy további információhoz jussunk a **HP2** cink(II)komplexeinek kötésmódját illetően,  $^1\text{H}$ -NMR-spektrumokat rögzítettünk  $\text{pH}^* = 5,94$ -nél változó fémion:ligandum aránynál. A spektrumsorozat kevés többletinformációt szolgáltat, ugyanis a szabad ligandummal összehasonlítva, alapvetően mindegyik jel – beleértve a nemkoordinálódó aminosavakat is – szélesedik, még kis mennyiségű cink hozzáadásakor is (6.1.3. ábra). Ez a jelenség azt a véleményünket erősíti, hogy a fémionok a **HP2** lehetséges kötőhelyei között megoszlanak, vagyis koordinációs izomerek léteznek, melyek egymással és a szabad ligandummal viszonylag lassú cserefolyamatban vannak.

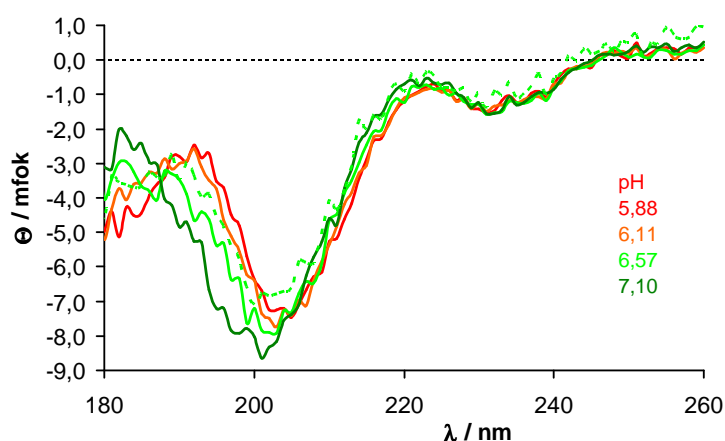


**6.1.3. ábra:** Az Ac-HHPHGHHPHG-NH<sub>2</sub> dekapeptid C<sup>2</sup>H and C<sup>5</sup>H His imidazol-proton jeleinek változása a cink(II):ligandum arány függvényében (D<sub>2</sub>O,  $\text{pH}^* = 5,94$ ,  $T = 298\text{ K}$ ,  $[\text{HP2}]_{\text{tot}} = 4,6 \times 10^{-3}\text{ M}$ )



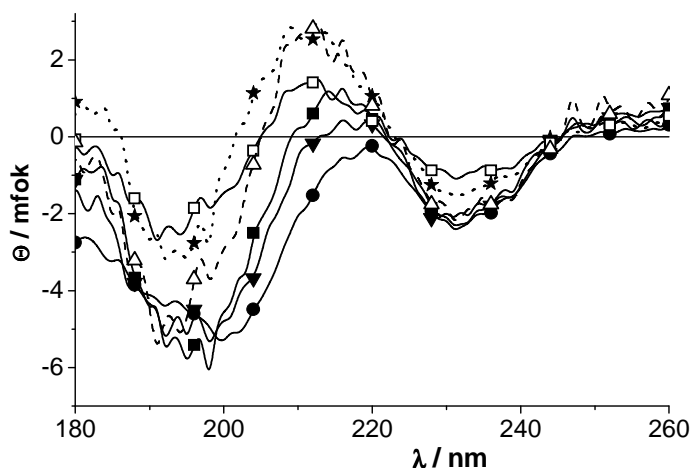
A **HP1** és **HP2** cinkkel való kölcsönhatásáról hasznos információt nyújtanak a szinkrotron radiációs cirkuláris dikroizmus (SRCD) spektrumok, mert a 180 nm-ig kiértékelhető UV tartományban jelentős változás következik be a protonálódási/deprotonálódási és komplexképződési folyamatok során [144]. Mindkét peptid SRCD spektruma emlékeztet a proliprolin II szerkezetnél megfigyeltekhez, ami nem meglepő, mert a rövid peptidek előszeretettel veszik fel ezt a szerkezetet [145]. Másrészt a spektrális mintázat nagyon hasonló a HRG fehérje His/Pro-gazdag alegységére jellemző görbékre [74,84]. A pH növelésével a 180-185 nm közötti hullámhossz tartományban fokozatosan, de csak kis mértékben pozitívabb, a 185-205 nm közötti tartományban pedig negatívabb ellipticitás értékek mérhetők, ami arra utal, hogy a deprotonálódási folyamatok miatt csupán csekély változás jelenik meg a konformációban. Érdeemes megemlíteni, hogy a két ligandum SRCD spektrumának alakja igen hasonló a megfelelő pH értékeken, míg az intenzitás a **HP2**-nél azonos koncentráció mellett kb. kétszeres volt (6.1.4. ábra). Ez arra enged következtetni, hogy a két HHPHG egység egymástól függetlenül, közel azonos konformációt vesz fel.

A fémiont tartalmazó minták vizsgálatához a pH értékeket úgy választottuk ki, hogy a lehető legjobb összhangban legyenek az eloszlásgörbékkel, azaz a képződő  $[\text{ZnL}]^{2+}$ , illetve  $[\text{Zn}_2\text{L}]^{4+}$  részecskék maximumánál legyenek. A cink(II) jelenléte szignifikáns növekedést okoz az SRCD intenzitásban a ~ 195-230 nm közötti tartományban, és néhány esetben pozitív sáv jelenik meg 214-219 nm között (6.1.5. ábra). A cink(II) hatását legmeggyőzőbben az 1:1 arányú rendszerben, pH = 6,62-nél felvett spektrum bizonyítja, ami a proliprolin I szerkezet CD mintázatára hasonlít inkább, nem pedig a proliprolin II szerkezetére [146,147].



**6.1.4. ábra:** A **HP2** ligandum SRCD spektruma a hisztidin oldalláncok deprotonálódásának pH tartományán belüli értékeken. A kismértékű változás a görbék alakjában és intenzitásában azt tükrözi, hogy a ligandum protonáltsági állapota nincs különösebb hatással a konformációra. Ugyanez elmondható a **HP1** ligandumról is, mely spektrumának kétszeresét pH = 6,67-on pontozott vonallal ábrázoljuk ( $[\text{HP1}]_{\text{tot}} = [\text{HP2}]_{\text{tot}} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $T = 298 \text{ K}$ ).

A megfigyelés igazolhatja, hogy a prolin peptidkötés *cisz* konformációból *transz* konformációba fordul át az oldalláncok cink(II)ionhoz történő koordinálódása során. A **HP1** és **HP2** peptidek  $[\text{ZnL}]^{2+}$  komplexeire jellemző SRCD spektrumok (6.1.5. ábra,  $\square$  és  $\blacksquare$  vagy  $\star$ ) összehasonlítása arra utal, hogy a két ligandumnál különböző a koordinációs mód, alátámasztva a pH-metriás eredmények alapján javasolt elképzelést, miszerint a **HP2** esetében több mint három nitrogén vesz részt a cink(II)ion megkötésében. A  $\star$  szimbólum egy olyan származtatott CD görbét jelöl, ahol azzal a feltevéssel élünk, hogy a **HP1** és **HP2**  $[\text{ZnL}]^{2+}$  komplexeiben ugyanolyan koordináció valósul meg, és a **HP2** szabad része úgy viselkedik, mint a szabad ligandum. Ebben az esetben az utóbbi CD hatása úgy ellensúlyozható, hogy a szabad ligandum megfelelő pH-n mért spektrumának  $\frac{1}{2}$ -szeresét kivonjuk az előbbi spektrumból. A  $\text{Zn}_2(\text{HP2})$  részecskét (6.1.5. ábra,  $\blacktriangledown$  és  $\bullet$ ) jelentős mennyiségben tartalmazó rendszerek görbéi szintén eltérnek a  $\text{Zn}(\text{HP1})$  spektrumának (6.1.5. ábra,  $\triangle$ ) kétszeresétől, jelezve a különböző koordinációs környezetet ezekben a komplexekben. A lehetséges izomerek közül feltehetőleg kitüntetett az a szerkezet, ahol a **HP2** (H)HPHGH központi egysége köti meg az első cink(II)iont, így a második fémiont a ligandum végein már előre kialakított kötőhely várja. Ez magyarázatot szolgáltat a  $\text{Zn}_2(\text{HP2})$  részecske megnövekedett stabilitására a  $\text{Zn}(\text{HP1})$  komplexszel szemben.



**6.1.5. ábra:** A **HP1** és **HP2** ligandumok SRCD spektruma különböző pH értékeken ( $[\text{HP1}]_{\text{tot}} = [\text{HP2}]_{\text{tot}} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $T = 298 \text{ K}$ ). Mindegyik rendszer esetében a rögzített spektrumból kivontuk a szabad ligandum spektrumát az eloszlásgörbék szerint a megfelelő pH értéken, és a kapott görbéket  $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$  koncentrációra normáltuk. A folytonos vonal **HP1** ( $\square$  – pH = 6,62; M:L = 1:1) és **HP2** ( $\blacktriangledown$  – pH = 6,16, M:L = 1:1;  $\blacksquare$  – pH = 6,57, M:L = 1:1;  $\bullet$  – pH = 6,15, M:L = 2:1) jelenlétében mért görbéket takar. A szaggatott és pontozott vonalak származtatott görbék:  $\triangle$  (szaggatott) – a **HP1** spektrum (pH = 6,62, M:L = 1:1) kétszerese, és  $\star$  (pontozott) – a **HP2** spektrumának  $\frac{1}{2}$ -szeresét kivontuk a megfelelő pH értéken a pH = 6,57-nél mért M:HP2 = 1:1 arányú spektrumból.

### 6.1.3. A HP1 és a HP2 peptidek kölcsönhatása réz(II)ionokkal

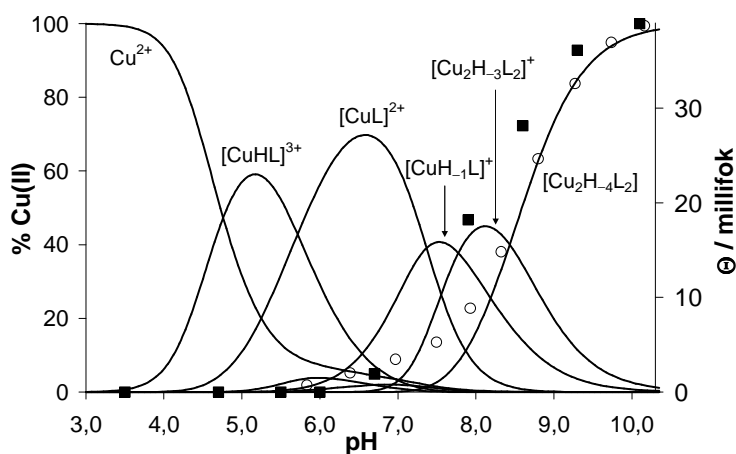
A **HP1** és **HP2** peptidek réz(II)kötő képességét kombinált pH-potenciometria, UV-látható, CD-,  $^1\text{H}$ -NMR- és ESR-módszerekkel tanulmányoztuk 2:1, 1:1 és 1:2 fém-ion:ligandum arányok mellett. A komplexek stabilitási állandói a 6.1.3. táblázatban találhatók.

$\text{M}_p\text{H}_q\text{L}_r$	HP1		HP2	
	$\log\beta_{\text{pqr}}$	$\text{p}K_{\text{pqr}}$	$\log\beta_{\text{pqr}}$	$\text{p}K_{\text{pqr}}$
$[\text{CuH}_4\text{L}]^{6+}$	–	–	31,71(3)	4,35
$[\text{CuH}_3\text{L}]^{5+}$	–	–	27,36(3)	5,09
$[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$	–	–	22,27(3)	5,77
$[\text{CuHL}]^{3+}$	12,65(2)	5,72	16,50(3)	6,47
$[\text{CuL}]^{2+}$	6,93(3)	7,37	10,03(3)	8,17
$[\text{CuH}_1\text{L}]^+$	–0,44(5)	–	1,86(9)	7,48
$[\text{CuH}_2\text{L}]$	–	–	–5,62(3)	9,64
$[\text{CuH}_3\text{L}]^-$	–	–	–15,26(3)	–
$[\text{CuHL}_2]^{3+}$	17,82(6)	6,70	–	–
$[\text{CuL}_2]^{2+}$	11,12(5)	–	–	–
$[\text{Cu}_2\text{H}_3\text{L}_2]^+$	–5,53(7)	8,43	–	–
$[\text{Cu}_2\text{H}_4\text{L}_2]$	–13,96(5)	–	–	–
$[\text{Cu}_2\text{HL}]^{5+}$	–	–	21,13(4)	5,19
$[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$	–	–	15,94(3)	6,65
$[\text{Cu}_2\text{H}_1\text{L}]^{3+}$	–	–	9,29(7)	6,50
$[\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}]^{2+}$	–	–	2,79(4)	–
$[\text{Cu}_2\text{H}_5\text{L}]^-$	–	–	–25,5(2)	10,5
$[\text{Cu}_2\text{H}_6\text{L}]^{2-}$	–	–	–36,0(2)	–

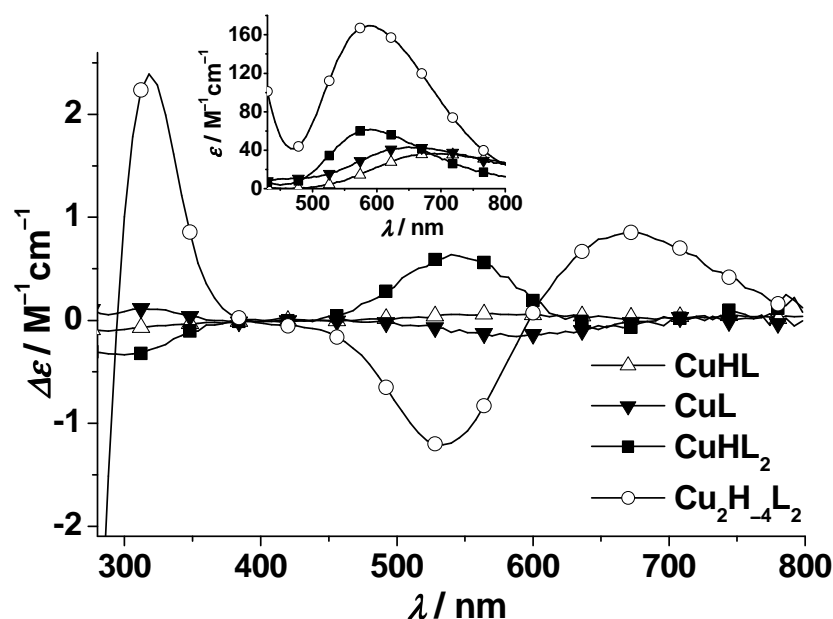
**6.1.3. táblázat:** A réz(II)komplexek bruttó stabilitási állandóinak logaritmusa ( $\log\beta_{\text{pqr}}$ ) és a származtatott  $\text{p}K_{\text{pqr}}$  értékek vízben ( $T=298\text{ K}$ ,  $I=0,1\text{ M NaCl}$ ). A zárójelben az utolsó értékes jegy hibája látható

A **HP1**-et tartalmazó rendszerekben a komplexképződési folyamatok  $\text{pH} \sim 4$  körül kezdődnek. A  $[\text{CuHL}]^{3+}$  az első detektálható részecske, melyet a  $[\text{CuL}]^{2+}$  tözskomplex követ (6.1.6. ábra). E kettő,  $\text{pH} \sim 7$  alatt uralkodó részecske  $\text{Cu}^{2+} + [\text{H}_q\text{L}]^{q+} = [\text{CuH}_q\text{L}]^{(2+q)+}$  egyensúlyra ( $q = 1, 0$ ) felírt képződési állandója ( $\log K = 5,71$  és  $6,93$ ) jó egyezésben van egyéb  $\{2\text{N}_{\text{im}}\}$  és  $\{3\text{N}_{\text{im}}\}$  koordinált prolintartalmú, hisztidinben gazdag peptidnél publikált értékekkel [19,23].

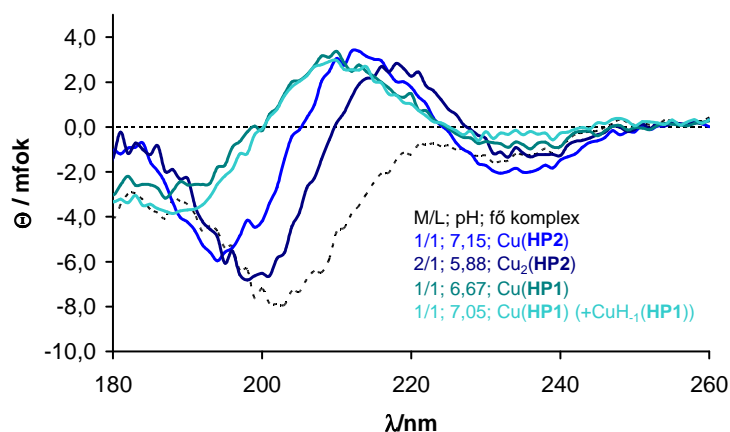
A  $[\text{CuHL}]^{3+}$  és  $[\text{CuL}]^{2+}$  komplexek spektroszkópiai paraméterei ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{d-d}} = 690$  és  $650$  nm;  $g_{\parallel} = 2,322$  és  $2,280$ ;  $A_{\parallel} = 156$  és  $163$  G) is a fenti koordinációs környezetet támasztják alá a fémion körül. A jelentősebb CD intenzitás hiánya a  $d-d$  és töltésátviteli sávok helyén (6.1.7. ábra) szintén az oldallánci donorcsoportok kizárólagos, makrokelát típusú kötődését mutatja a réz(II)ionhoz. A réz(II)ion koordinálódása révén kialakuló  $\text{Cu}(\text{HP1})$  komplex SRCD spektrális mintázata ( $\text{pH} = 6,67$ ) hasonló változást mutat, mint azt a cink(II)ion jelenlétében tapasztaltuk, de a hatás sokkal hangsúlyosabb (6.1.8. ábra). Ez összhangban áll azzal, hogy a ligandum konformációjának torzulása nagyobb fokú, a réz(II)komplex merevebb geometriai követelménye miatt, mint a megfelelő cink(II)komplexben. A  $[\text{CuL}]^{2+}$  komplex deprotonálódása ( $\text{p}K_{[\text{CuL}]^{2+}} = 7,37$ ) a  $[\text{CuH}_1\text{L}]^+$  részecske képződéséhez és a ligandum-térerősség szignifikáns növekedéséhez vezet ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{d-d}} = 590$  nm;  $g_{\parallel} = 2,248$ ;  $A_{\parallel} = 184$  G). A jelenség kétféleképpen magyarázható: (1) egy fémionhoz kötött víz molekula deprotonálódása, melynek révén  $\{3\text{N}_{\text{im}}, \text{OH}^-\}$  koordinációs környezet alakul ki, vagy (2) egy amidnitrogén deprotonálódása és koordinációja, melynek során kiszorít egy imidazol donort és  $\{2\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{H}_2\text{O}\}$  környezet alakul ki a réz(II)ion körül. A CD spektrumok hasznos információt nyújthatnak annak eldöntésére, hogy a két folyamat közül melyik játszódik le, ugyanis egy amidnitrogén koordinációja a peptidváz konformációjának megváltozását okozza, és határozottan közvetíti a királis perturbációt a ligandumról a fémközpontra [19]. A CD intenzitás megnövekedése  $320$  nm-nél és a látható tartományban (6.1.9.A ábra), illetve az SRCD görbe megváltozása (6.1.8. ábra)  $\text{pH}$   $6,5$ - $7,5$  között szerény. Ezek alapján a  $[\text{CuH}_1\text{L}]^+$  fő izomerje a helyesebben  $[\text{CuL}(\text{OH})]^+$  képlettel leírható,  $\{3\text{N}_{\text{im}}, \text{OH}^-\}$  koordinált részecske, míg az amidkoordinált izomer csekély mennyiségben van jelen.



**6.1.6. ábra:** Az 1:1 arányú réz(II)–**HP1** rendszer részecskeeloszlásgörbéje ( $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = [\text{HP1}]_{\text{tot}} = 1,0 \times 10^{-3}$  M,  $T=298$  K,  $I=0,1$  M NaCl). Az üres karikák (○) a  $320$  nm-en mért CD-intenzitás változását, míg a telt négyzetek (■) az oligomerek ESR-mérésekből ( $T=298$  K) meghatározott összkoncentrációját mutatják

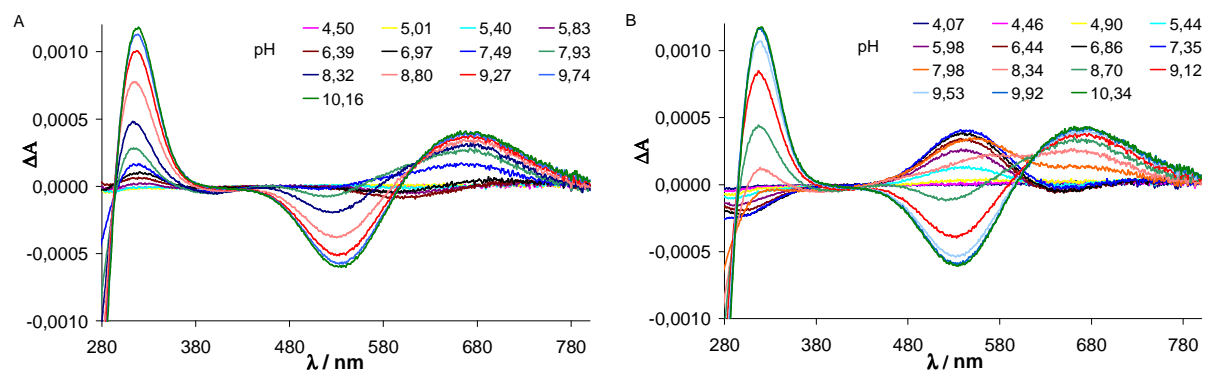


**6.1.7. ábra:** A réz(II)–**HP1** rendszerben képződő fő részecskék egyedi moláris CD- és UV-látható (beszűrt kép) spektrumai (I 0,1 M NaCl, T=298 K)

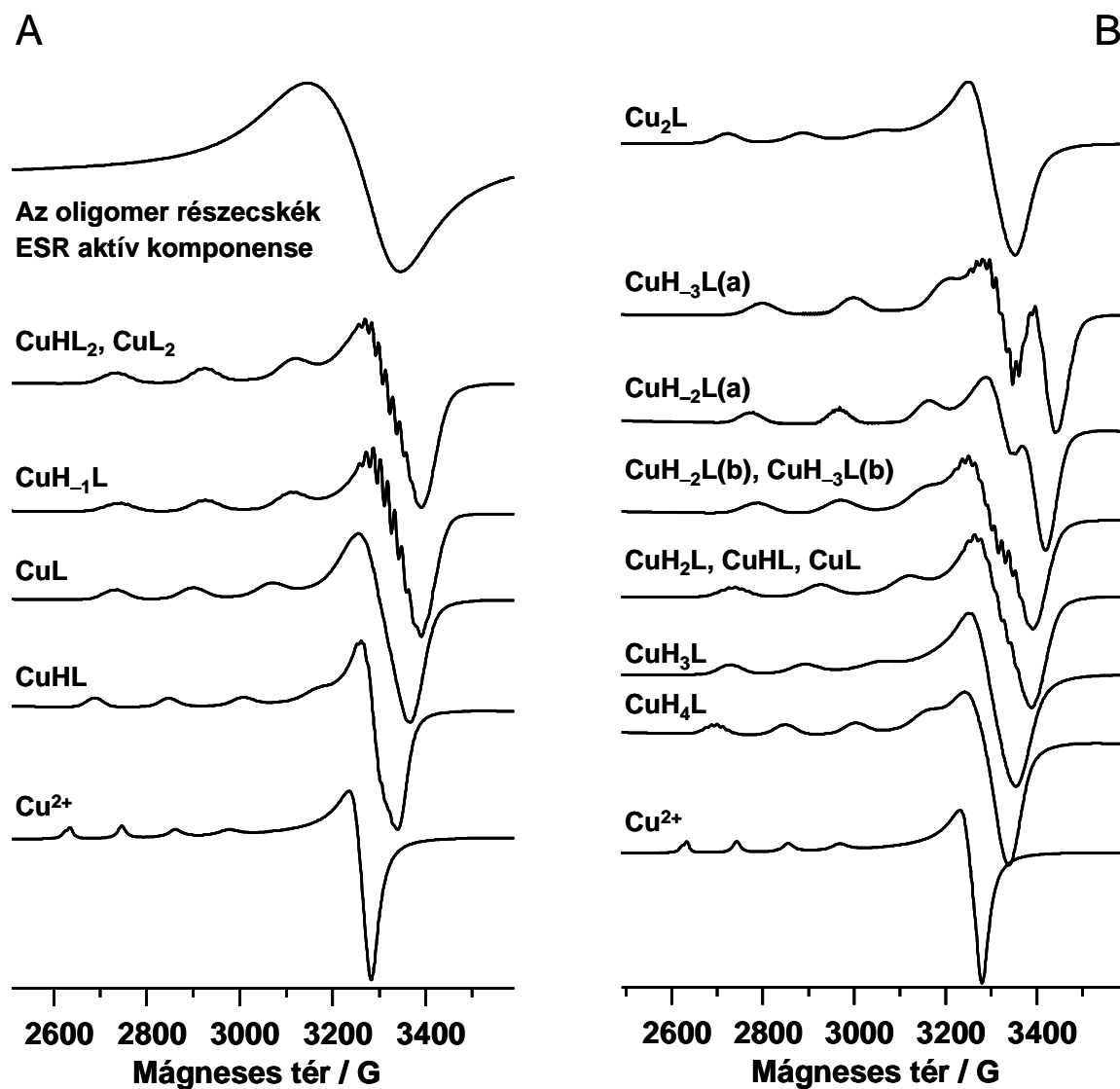


**6.1.8. ábra:** A **HP2** és **HP1** ligandumok SRCD-spektrumai különböző pH értékeken ( $[\text{HP2}]_{\text{tot}} = [\text{HP1}]_{\text{tot}} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ , T=298 K). Mindegyik rendszer esetében a rögzített spektrumból kivontuk a szabad ligandum spektrumát az eloszlásgörbék szerint a megfelelő pH értéken, és a kapott görbéket  $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$  koncentrációra normáltuk. Viszonyításként bemutatjuk a **HP2** ligandum pH = 6,57-on mért spektrumát is (szaggatott vonal)

A **HP1**-et a réz(II)hez képest kétszeres feleslegben tartalmazó oldatokban kirívó mértékben képződnek bisz-komplexek a fentebb említett részecskék mellett. Létezésüket tisztán bizonyítja a jellegzetes pozitív CD sáv megjelenése 545 nm körül pH 6-8 között (6.1.9.B ábra), melyet az Ac-HPHPH-NH<sub>2</sub> bisz-komplexeinél [23] és egyéb bisz-hisztamin szerű komplexeknél is megfigyeltek [149].



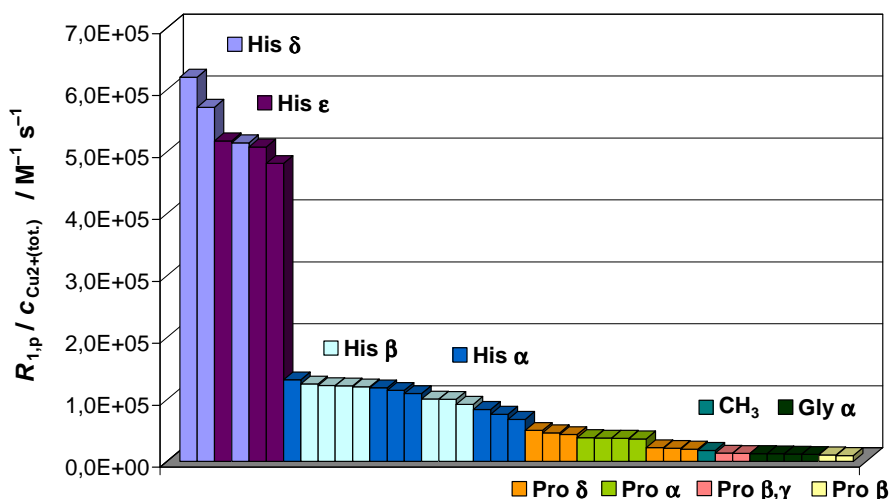
**6.1.9. ábra:** Az 1:1 (A) és 1:2 (B) réz(II)–HP1 arányú rendszerek CD-spektrumainak pH függése  
 ( $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $T = 298 \text{ K}$ ,  $I = 0,1 \text{ M NaCl}$ )



**6.1.10. ábra:** A különböző fémion:ligandum arányú réz(II)–HP1 (A) és a réz(II)–HP2 (B) rendszerekben 77 K-en felvett anizotróp ESR-spektrumok szimulációja során nyert komponens spektrumok

A  $[\text{CuHL}_2]^{3+}$  és  $[\text{CuL}_2]^{4+}$  biszkomplexek azonos spektrális tulajdonságokkal bírnak (6.1.7. és 6.1.10. ábrák), ami arra enged következtetni, hogy a  $[\text{CuHL}_2]^{3+}$  deprotonálódásában nincs szerepe a fémionnak. A biszkomplexek komponens ESR-spektrumán megjelenő nagyfelbontású szuperhiperfinom szerkezet szimulációja (6.1.10. ábra) valamint a  $\lambda_{\text{max}}^{\text{d-d}} \sim 590$  nm érték  $\{4N_{\text{im}}\}$  típusú koordinációt sugall (az elméletileg számolható érték  $\sim 585$  nm lenne [137]), mely kiegészülhet egy ötödik imidazol esetleges nagyon gyenge axiális kötődésével.

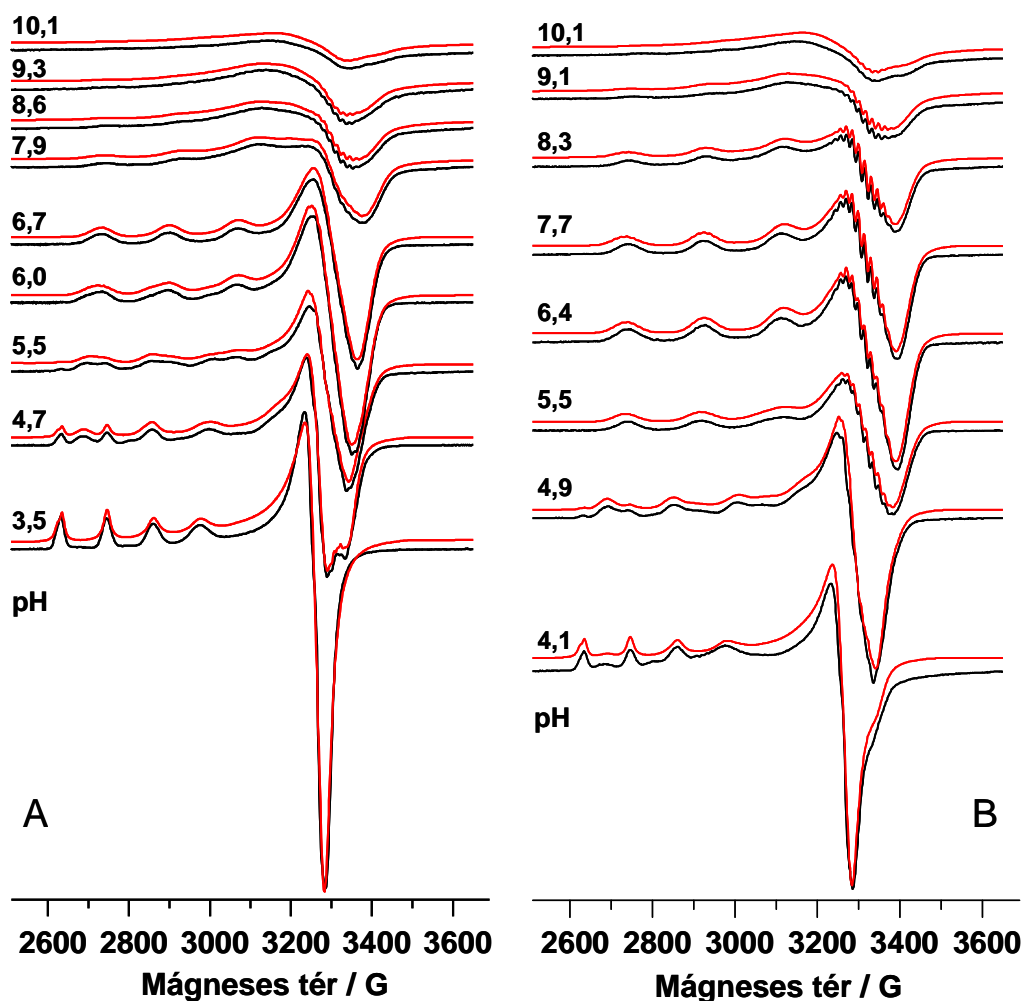
Az imidazol donorok kizárólagos koordinációját a T1 proton relaxációs méréseink eredményei is megerősítették. A paramágneses központ közelsége miatt a His- $\text{C}^2\text{H}$  és His- $\text{C}^5\text{H}$  hidrogének paramágneses relaxáció sebességének növekedése sokkal szembetűnőbb, mint a **HP1** másfajta protonjaié (6.1.11. ábra). Másfelől a His1, His2 vagy His4 alegységek azonos típusú protonjaira számolt értékek közel esnek egymáshoz, ami azt feltételezi, hogy a biszkomplexekben a különböző helyzetű hisztidinek között nincs olyan, amelyik előnyt élvezne a fémkötést illetően.



**6.1.11. ábra:** A **HP1** ligandum különböző protonjainak réz(II)ion okozta paramágneses relaxációs sebességének növekedése 298 K-en  $\text{D}_2\text{O}$ -ban ( $\text{pH}^* = 7,9$ ). A **HP1** koncentrációja  $6,0 \times 10^{-3}$  M és a réz(II) koncentráció  $6,1 \times 10^{-6}$  M és  $5,9 \times 10^{-4}$  M között változott

Tulajdonképpen mindegyik fémion:ligandum aránynál alapvető változást okoznak a spektroszkópiai tulajdonságokban a pH 7-8 fölött bekövetkező további deprotonálódási folyamatok (6.1.9. és 6.1.12. ábrák). A felvett izotróp és anizotróp spektrumokon pH 7-10 között a jel intenzitása folyamatosan csökken, amit nem lehet vonalszélesedéssel megmagyarázni. A jelenség oligomer (legalább dimer) részecskék jelenlétére utal, melyekben a réz(II)központok antiferromágneses kölcsönhatásban vannak egymással. A maradék ESR-jel

pH 10-nél szintén dimer/oligomer részecskékhez tartozik, kevésbé közvetlen fémionok közötti csatolással. Ez a megfigyelés az oligomer részecskék meglehetősen bonyolult izomer egyensúlyait vonja maga után. A pH 7 fölötti potenciometriás adatok legjobban két egymást követő komplexképződési folyamattal, azaz dimerek kialakulásával illeszthetők meg (6.1.3. táblázat, 6.1.6. ábra).



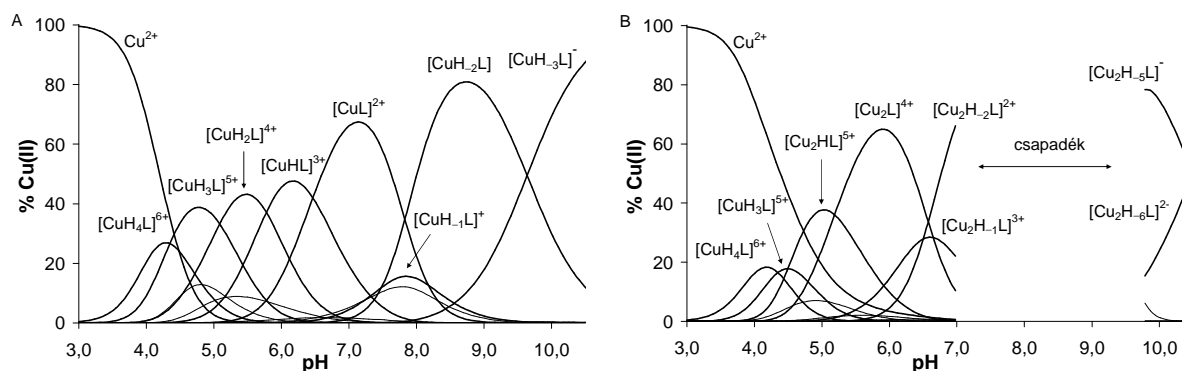
**6.1.12. ábra:** Az 1:1 arányú (A) és 1:2 arányú (B) réz(II)–HP1 rendszerek 77 K-en rögzített anizotróp ESR-spektrumai (fekete vonal) és a szimulált görbék (piros vonal). ( $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = 1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $I = 0,1 \text{ M NaCl}$ )

A dimer komplexek nagyon hasonló ESR-spektrummal rendelkeznek, ezek ESR-ből számolt összkoncentrációja (teli négyzetek a 6.1.6. ábrán) szépen követi a potenciometriából meghatározott két komplex képződését. A 320 nm-en mért CD intenzitás (6.1.6. ábra, üres karika) párhuzamosan növekszik a  $[\text{Cu}_2\text{H}_4\text{L}_2]$  kialakulásával pH ~ 8 fölött. Az intenzív CD-sáv 320 nm-nél és a 450-750 nm tartományban megjelenő CD „couplet” azt bizonyítja, hogy deprotonálódott amidnitrogének kötődnek a  $[\text{Cu}_2\text{H}_4\text{L}_2]$  réz(II)központjaihoz. Az ESR-aktív



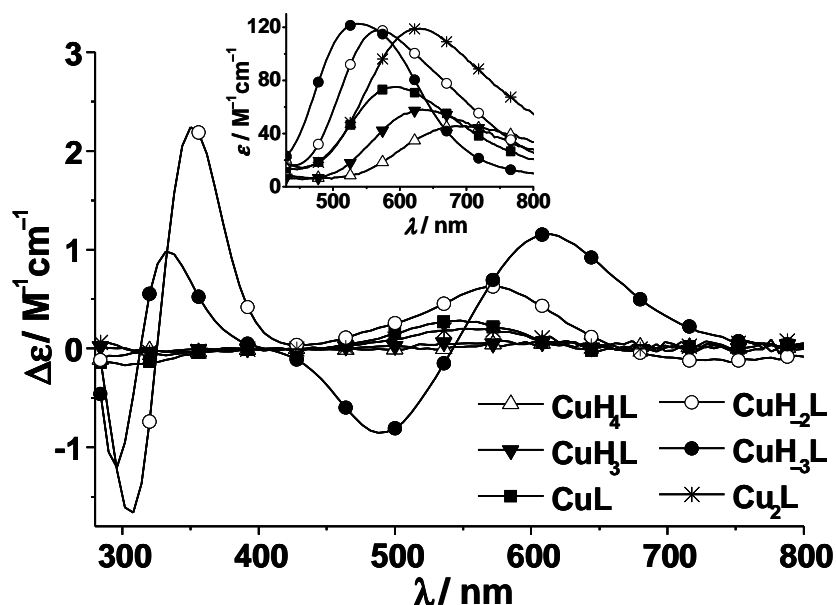
és csendes oligomereknek különböző szerkezetük kell legyen, de a jelenlegi spektroszkópai adataink nem elegendőek ezek egyértelmű meghatározásához. A pH-t tovább növelve újabb deprotonálódási folyamatok indultak el, melyek pH ~ 11-re egy nem-egyensúlyi rendszerhez vezettek a ligandum átalakulása miatt. Mivel pH ~ 10-ig ez a folyamat nem számottevő, ezért méréseinket csak pH 10,1-ig értékeltük.

A réz(II)–**HP2** rendszer ekvimoláris oldatában számos egymagvú komplex képződik pH 3,5-7 között, melyekben a ligandum különböző protonáltsági állapotban van (6.1.13A. ábra). A **HP1**-gyel ellentétben, a dekapeptidnél nem tapasztaltuk semelyik fémion:ligandum arány-nál bisz-komplexek képződését. A ligandum lépcsőzetes deprotonálódása a komplexen belül (a  $[\text{CuH}_4\text{L}]^{6+}$  részecskétől a  $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$  részecskéig) a  $d-d$  sávok folyamatos kék eltolódását eredményezi (6.1.14. ábra). Ez az észrevétel a meghatározott ESR paraméterekkel együtt (6.1.4. táblázat) a nitrogén donorok számának növekedését bizonyítja a réz(II) koordinációs környezetében. A leolvasott  $d-d$  maximumok helye alapján (692, 634, és 594 nm a  $[\text{CuLH}_4]^{6+}$ ,  $[\text{CuLH}_3]^{5+}$  és a  $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$  részecskére vonatkozóan)  $\{2\text{N}_{\text{im}}, 2\text{H}_2\text{O}\}$ ,  $\{3\text{N}_{\text{im}}, \text{H}_2\text{O}\}$  illetve  $\{4\text{N}_{\text{im}}\}$  típusú donor elrendeződés javasolható a részecskékre. (Az empirikus adatok alapján az abszorpciós maximum helye 692, 634 és 585 nm környékére tehető [137].) A szignifikáns CD-intenzitás hiánya a  $d-d$  átmenetek hullámhossz tartományában (6.1.14. ábra) szintén alátámasztja az imidazol oldalláncok kizárólagos kötődését. A  $[\text{CuHL}]^{3+}$  és  $[\text{CuL}]^{2+}$  kialakulásához vezető további két deprotonálódás nem okoz látványos változást a spektroszkópai paraméterekben, vagyis a maradék két hisztidin imidazol csoportról a fémion közreműködése nélkül távoznak el a protonok. Ennek ellenére egy ötödik nitrogén gyenge axiális koordinációja nem zárható ki, mert a  $[\text{CuL}]^{2+}$  részecske stabilitása ( $\log K = 10,03$ ) valamivel nagyobb, mint a hisztidingazdag peptideknél megszokott  $\{4\text{N}_{\text{im}}\}$  koordinált komplexek stabilitása [14,21,150].



6.1.13. ábra: A réz(II)–**HP2** rendszer 1:1 arányú (A) és 2:1 arányú (B) részecskeeloszlási diagramja

( $[\text{HP2}]_{\text{tot}} = 1,0 \times 10^{-3}$  M,  $T = 298$  K,  $I = 0,1$  M NaCl)



**6.1.14. ábra:** A réz(II)–**HP2** rendszerben képződő fő részecskék egyedi moláris CD- és UV-látható (beszúrt kép) spektrumai ( $I=0,1$  M NaCl,  $T=298$  K). A  $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$ ,  $[\text{CuHL}]^{3+}$  és  $[\text{CuL}]^{2+}$  komplexek egyedi spektrumai azonosak

Fontos megjegyezni, hogy a **HP2** peptid hat imidazol donorcsoportja számos lehetőséget kínál a réz(II) körüli négyes koordináció kialakítására, így igen valószínű, hogy a fentebb tárgyalt részecskék ( $[\text{CuLH}_4]^{6+} \rightarrow [\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$ ) izomereket takarnak. A kötési alternatívák közül néhány még kedvezőbb is lehet, mint a **HP1** nyújtotta HHPH mintázat. Ezt támasztja alá az a tény, hogy a  $[\text{CuH}_3\text{L}]^{5+}$  komplex SRCD-spektrumának alakja eltérő a réz(II)–**HP1** rendszerben mért spektrum alakjától. A rendelkezésünkre álló adatok alapján azonban nem lehet a kötési izomereket megkülönböztetni. pH  $\sim 7$  felett két erősen kooperatív deprotonálódási folyamat vezet a pH  $\sim 8,7$  körül uralkodó  $[\text{CuH}_2\text{L}]$  részecskéhez (6.1.13.A ábra). Hasonló együttműködést tulajdonítottak jó néhány His-X-His mintázatot ( $X \neq \text{Pro}$ ) tartalmazó peptid réz(II) által elősegített két szomszédos amidcsoport deprotonálódásának [11,18,20,148]. A **HP1**-gyel ellentétben, a **HP2** tartalmaz egy HGH(H) szelvényt a közepén, ami képes ilyen,  $\{\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}\}$  típusú koordinációt nyújtani a réz(II)ionnak.

A  $[\text{CuH}_2\text{L}]$  képződése során észlelt spektrális változások (6.1.14. ábra) szintén a fémion környezetének újrendeződésére utalnak. Egy intenzív réz(II)–amid töltésátviteli sáv megjelenése és a megnövekedett CD-intenzitás a  $d-d$  tartományban igazolja az amidnitrogén koordinálódását ebben a komplexben. A megfigyelt  $\lambda_{\text{max}}^{d-d}$  érték (570 nm) számottevően nagyobb, mint az empirikus paraméterek alapján számolt (530 nm [137]) a  $\{2\text{N}_{\text{im}}, 2\text{N}^-\}$  kötismódra.

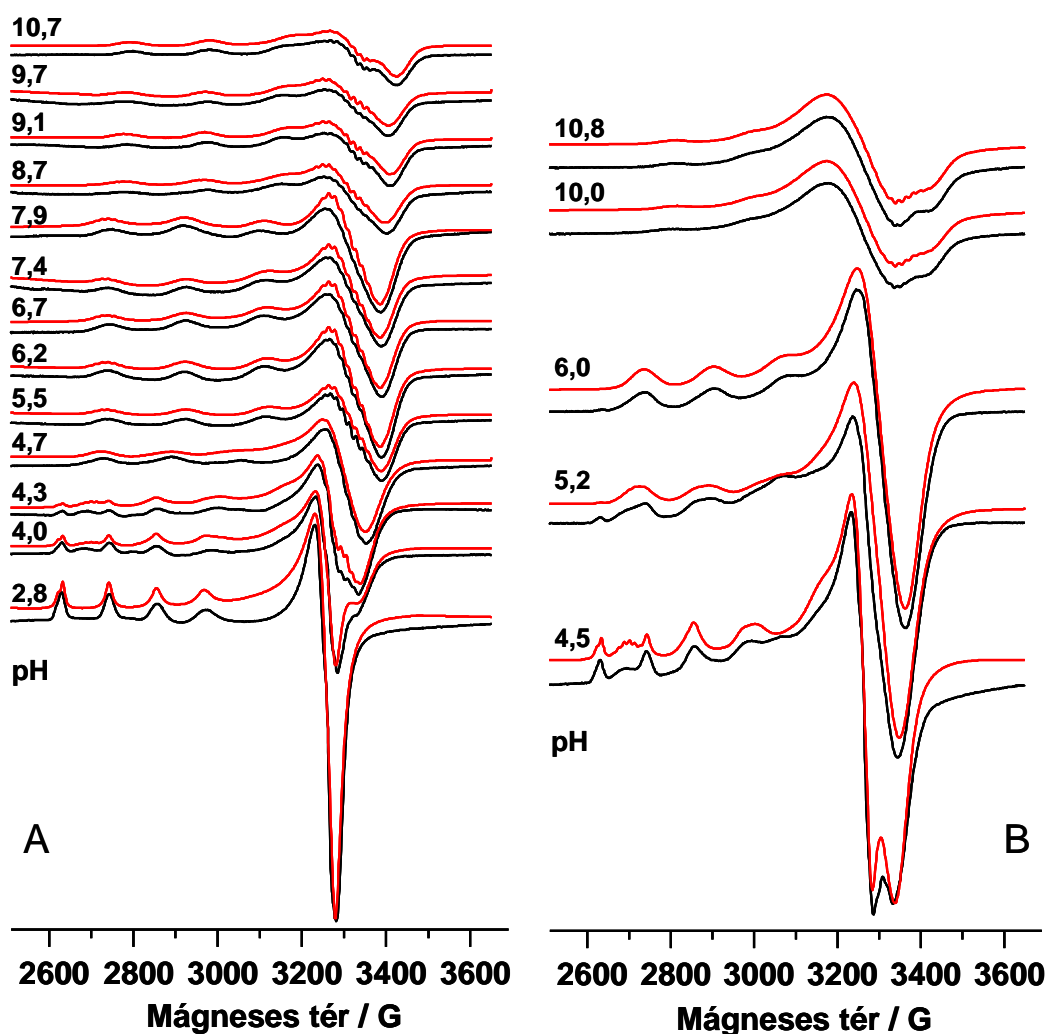
A 30 nm-nyi eltérést okozhatja egy imidazol oldallánc axiális koordinációja [138], ahogy azt az Ac-HHGH-OH hasonló komplexénél javasoljuk [18]. Az egyedi UV-látható spektrum széles alakja és a **HP2** potenciális donorcsoportjainak nagy száma mindemellett felveti annak lehetőségét is, hogy különböző koordinációval rendelkező izomerek vannak jelen.

Az alacsony hőmérsékletű (77 K) ESR-spektrumok felbontása (6.1.10.B és 6.1.15. ábrák) is csak úgy volt megoldható, hogy feltételeztük a  $[\text{CuH}_2\text{L}]$ -nek kettő, némiképpen eltérő ESR-paraméterekkel bíró izomerjét (6.1.4. táblázat). A  $[\text{CuH}_2\text{L}](\text{a})$  komplexben a fémion valószínűleg a **HP2** HGH szelvényéhez koordinálódik  $\{\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}\}$  kötési módot kialakítva.

Komponensek	$g_{\parallel}$	$g_{\perp}$	$A_{\parallel}$ (G)	$A_{\perp}$ (G)	$a_{\text{N}}$ (G)
<b>L = HP1</b>					
$\text{Cu}^{2+}$	2,425	2,082	112	8	
$[\text{CuHL}]^{3+}$	2,322	2,062	155,6	14	11, 11
$[\text{CuL}]^{2+}$	2,280	2,051	163	18	15, 15, 10
$[\text{CuH}_1\text{L}]^+$	2,248	2,048	184	20	17, 16, 15
$[\text{CuHL}_2]^{3+}, [\text{CuL}_2]^{2+}$	2,252	2,047	180	20	17, 17, 13, 13
Az oligomerek ESR-aktív komponense	2,12			65	
<b>L = HP2</b>					
$\text{Cu}^{2+}$	2,425	2,082	110,5	8	
$[\text{CuH}_4\text{L}]^{6+}$	2,320	2,060	150	15	12, 12
$[\text{CuHL}]^{3+}$	2,284	2,053	160	15	12, 12, 6
$[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}, [\text{CuHL}]^{3+}, [\text{CuL}]^{2+}$	2,248	2,048	185,7	15	16, 16, 12, 12
$[\text{CuLH}_2](\text{a})$	2,217	2,038	189,8	14	15, 15, 10, 10
$[\text{CuLH}_3]^{-}(\text{a})$	2,190	2,035	193,4	18	16, 16, 11, 11
$[\text{CuH}_2\text{L}](\text{b}), [\text{CuH}_3\text{L}]^{-}(\text{b})$	2,219	2,055	177	17	16, 16, 13, 13
$[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$	2,284	2,053	160	15	12, 12, 6

**6.1.4. táblázat:** A réz(II)–Ac-HHPHG-NH<sub>2</sub> és az réz(II)–Ac-HHPHGHPHG-NH<sub>2</sub> rendszerekben képződő komplexek anizotróp ESR-paraméterei. Az utolsó számjegy becslési hibája  $\pm 1$

A  $[\text{CuH}_2\text{L}](\text{b})$  komplexben a ligandumtér erőssége valamivel gyengébb, és feltehetőleg a  $\{\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{H}_2\text{O}\}$  koordinációs környezet valósul meg a His2, His7 vagy His9 alegység részvételével. Az ESR-vizsgálatok szerint a  $[\text{CuH}_2\text{L}]$ -t követő  $[\text{CuH}_3\text{L}]^-$  komplex is két izomerből áll. A  $[\text{CuH}_3\text{L}]^-(\text{b})$  azonos paraméterekkel írható le, mint a  $[\text{CuH}_2\text{L}](\text{b})$ , vagyis szintén  $\{\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{H}_2\text{O}\}$  koordinációs szféra található ebben a részecskében. A  $[\text{CuH}_3\text{L}]^-(\text{a})$  komplexre jellemző  $g$  érték kisebb, az  $A$  érték nagyobb, összehasonlítva bármelyik  $[\text{CuH}_2\text{L}]$  izomerrel, ami arra enged következtetni, hogy az egyik ekvatoriális imidazol donor deprotonált amidnitrogénre cserélődik,  $\{\text{N}_{\text{im}}, 3\text{N}^-\}$  szerkezetet eredményezve. A  $[\text{CuH}_2\text{L}]$  és  $[\text{CuH}_3\text{L}]^-$  komplexek UV-látható és CD-sajátságaiiban megnyilvánuló szembeszökő különbség összhangban áll az imént említett réz(II) körüli átrendeződéssel, s azt jelzi, hogy 298 K-en a  $[\text{CuH}_3\text{L}]^-(\text{a})$  a fő részecske az oldatban.



**6.1.15. ábra:** Az 1:1,5 arányú (A) és 2:1 arányú (B) réz(II)–HP2 rendszerek 77 K-en rögzített anizotróp ESR-spektrumai (fekete vonal) és a szimulált görbék (piros vonal). ( $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = 1,1 \times 10^{-3} \text{ M}$  (A),  $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = 2,3 \times 10^{-3} \text{ M}$  (B),  $I=0,1 \text{ M NaCl}$ )

2:1 fémion:ligandum aránynál kétmagvú komplexek dominálnak az oldatban pH 5 felett (6.1.13.B ábra). pH 7-10 között csapadék vált ki az oldatból és leszűkítette a vizsgálódási lehetőségeinket az enyhén savas pH tartományra. Az egymagvú  $[\text{CuH}_3\text{L}]^{5+}$  komplex ESR-paramétereivel hibahatáron belül megegyeznek a pH 6 körül uralkodó  $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$  részecske mérőszámai (6.1.4. táblázat), ami arról tanúskodik, hogy a  $\{3\text{N}_{\text{im}}\}$  koordinált réz(II) központok egymástól függetlenek. Az imidazol oldalláncok kizárólagos koordinációját támasztja alá a részecske kis intenzitású CD-spektruma töltésátviteli és *d-d* sávokban. A  $[\text{CuL}]^{2+} + \text{Cu}^{2+} = [\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$  folyamatra kiszámolt  $\log K = 5,91$  egyensúlyi állandó figyelemre méltó affinitásról árulkodik a második réz(II) megkötését illetően, főképpen ha figyelembe vesszük a rendelkezésre álló imidazolok lecsökkent számát. A cink(II)tartalmú rendszerekhez hasonlóan a képződési állandók azt tükrözik, hogy a **HP1**-gyel összevetve a **HP2** extra stabilizációt biztosít a réz(II)ionok számára ( $\Delta_{\text{Cu}} = \log \beta_{\text{Cu}_2(\text{HP2})} - 2 \times \log \beta_{\text{Cu}(\text{HP1})} = 2,08$ ). Mindez azt sejteti, hogy a  $\text{Cu}_2(\text{HP2})$ -ben a fémionok kötésmódja más, mint a  $\text{Cu}(\text{HP1})$ -ben. A  $\text{Cu}_2(\text{HP2})$ -re jellemző SRCD-spektrum is ezt erősíti meg, ugyanis észrevehetően nem a  $\text{Cu}(\text{HP1})$  kétszerese. A nagy extra stabilizáció oka valószínűleg abban keresendő, hogy a második réz(II) már egy előre előre kialakított kalitkában kötődik meg, hasonlóan a cink(II)tartalmú rendszerekhez.

A csapadék pH  $\sim 10$  fölött feloldódik, ami arra utal, hogy magas pH-n deprotonált kétmagvú komplexek léteznek. Mivel a csapadék széles pH tartományban volt jelen, a kétmagvú részecskék szerkezetének leírása nem volt lehetséges.

## 6.2. Az endostatin N-terminális fragmens fémkötő tulajdonságainak vizsgálata

### 6.2.1. A HSHRDFQPVLHL-NH<sub>2</sub> (L) peptid protonálódási viszonyai

A peptid-fémion rendszerek vizsgálata előtt a ligandum sav-bázis egyensúlyait határoztuk meg. A ligandum öt olyan donorcsoporttal rendelkezik, mely a pH 2-11 tartományban (de)protonálódásra képes (NH<sub>2</sub>, 3 His, 1 Asp; [H<sub>5</sub>L]<sup>4+</sup> ↔ [L]<sup>-</sup>). Az első és utolsó deprotonálódás a terminális amino- és az aszparaginsav karboxilcsoportjához rendelhető. A hisztidin-imidazolgyűrűk deprotonálódási folyamatai igen átfedőek, ezért a 6.2.1. táblázatban feltüntetett makroszkópikus állandókat és pK értékeket nem lehet egyedi hisztidin egységekhez rendelni. A vizsgált pH-tartományban az arginin oldallánc deprotonálódását nem tapasztaltuk.

H <sub>q</sub> L <sub>r</sub>	logβ <sub>pqr</sub>		pK <sub>pqr</sub>	
	H <sub>2</sub> O	DMSO	H <sub>2</sub> O	DMSO
[HL]	7,44(2)	7,48(7)	7,44	7,48
[H <sub>2</sub> A] <sup>+</sup>	13,99(2)	13,79(7)	6,55	6,31
[H <sub>3</sub> A] <sup>2+</sup>	19,99(2)	19,36(8)	6,00	5,57
[H <sub>4</sub> A] <sup>3+</sup>	25,03(2)	24,42(7)	5,04	5,06
[H <sub>5</sub> A] <sup>4+</sup>	28,44(2)	28,64(7)	3,41	4,22

**6.2.1. táblázat:** A protonkomplexek bruttó stabilitási állandóinak logaritmusa (logβ<sub>pqr</sub>) és pK<sub>pqr</sub> értékei vízben és DMSO-ban (T=298K, I=0,1 M NaCl). A zárójelben az utolsó értékes jegy hibája látható.

### 6.2.2. A HSHRDFQPVLHL-NH<sub>2</sub> (L) peptid kölcsönhatása cink(II)ionokkal

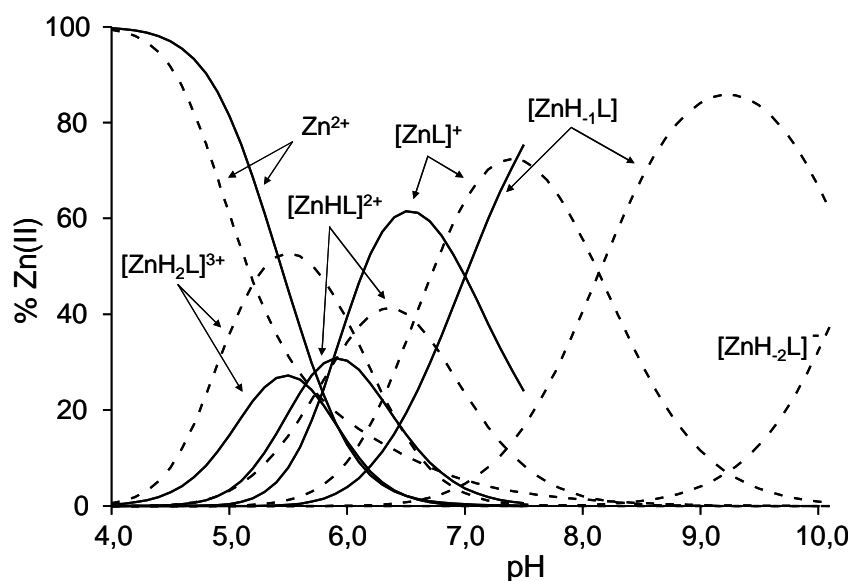
Vizes közegben a peptid (L) cink(II)ionokkal különböző protonáltsági állapotú komplexeket ([ZnH<sub>2</sub>L]<sup>3+</sup>, [ZnHL]<sup>2+</sup>, [ZnL]<sup>+</sup>, [ZnH<sub>-1</sub>L]) képez pH 3-7 között (6.2.1. ábra). A komplexek képződési állandóit a 6.2.2. táblázat tartalmazza. Kis oldhatóságú cink(II)-L részecske kialakulása miatt pH ~ 7 fölött még ligandumfelesleg esetében is csapadék jelent meg vizes oldatainkban. A [ZnH<sub>2</sub>L]<sup>3+</sup> részecske protonáltsági állapota és viszonylag nagy stabilitása két nitrogén koordinációját sejteti. Ismert, hogy a cink(II) kedveli az N-terminálisukon védetlen hisztidint tartalmazó peptidek nyújtotta {NH<sub>2</sub>,N<sub>im</sub>} hisztamin-szerű kötéstípust [1,4,27,151].

Ha figyelembe vesszük, hogy a HXH egységek nyújtotta {2N<sub>im</sub>} makrokelát kisebb stabilitást biztosít [14], mint ami megfigyelhető a ([ZnH<sub>2</sub>L]<sup>3+</sup> komplexben, akkor feltételezhető a hisztamin-szerű koordináció. A következő alacsony pK<sub>pqr</sub> értékkel jellemezhető két deprotonálódás (pK<sub>[ZnH<sub>2</sub>L]<sup>3+</sup></sub> = 5,65, pK<sub>[ZnHL]<sup>2+</sup></sub> = 5,88) praktikusán a maradék két hisztidin ol-

dallánc ( $^3\text{H}$  és  $^{11}\text{H}$ ) deprotonálódásához rendelhető, melyet a cink segít elő. Valóban, a  $\text{Zn}^{2+} + [\text{L}]^- = [\text{ZnL}]^+$  folyamat egyensúlyi állandója ( $\log K = 6,11$ ) nagyobb, mint a HVH  $\{\text{NH}_2, 2\text{N}_{\text{im}}\}$  koordinált komplexének ide vonatkozó állandója ( $\log K = 5,94$ ) [27]. A harmadik imidazol extra stabilizáló hatása azonban igen szerény, ami kétséget támaszt az  $\{\text{NH}_2, 3\text{N}_{\text{im}}\}$  típusú koordináció létét illetően a  $[\text{ZnL}]^+$  részecskében. NMR-spektroszkópiával,  $\text{D}_2\text{O}$ -ban szeretnénk volna tisztázni a kötőmódot, ami kudarcot vallott, mert az alkalmazott koncentrációnál már közel pH 6-nál csapadék képződött. A cink(II)–L rendszer egyensúlyi viselkedését emiatt 80 (m/m)% DMSO/ $\text{H}_2\text{O}$  elegyben is nyomon követtük (6.2.2. táblázat), ahol a vizsgált pH tartományban oldható komplexek képződtek (6.2.1. ábra).

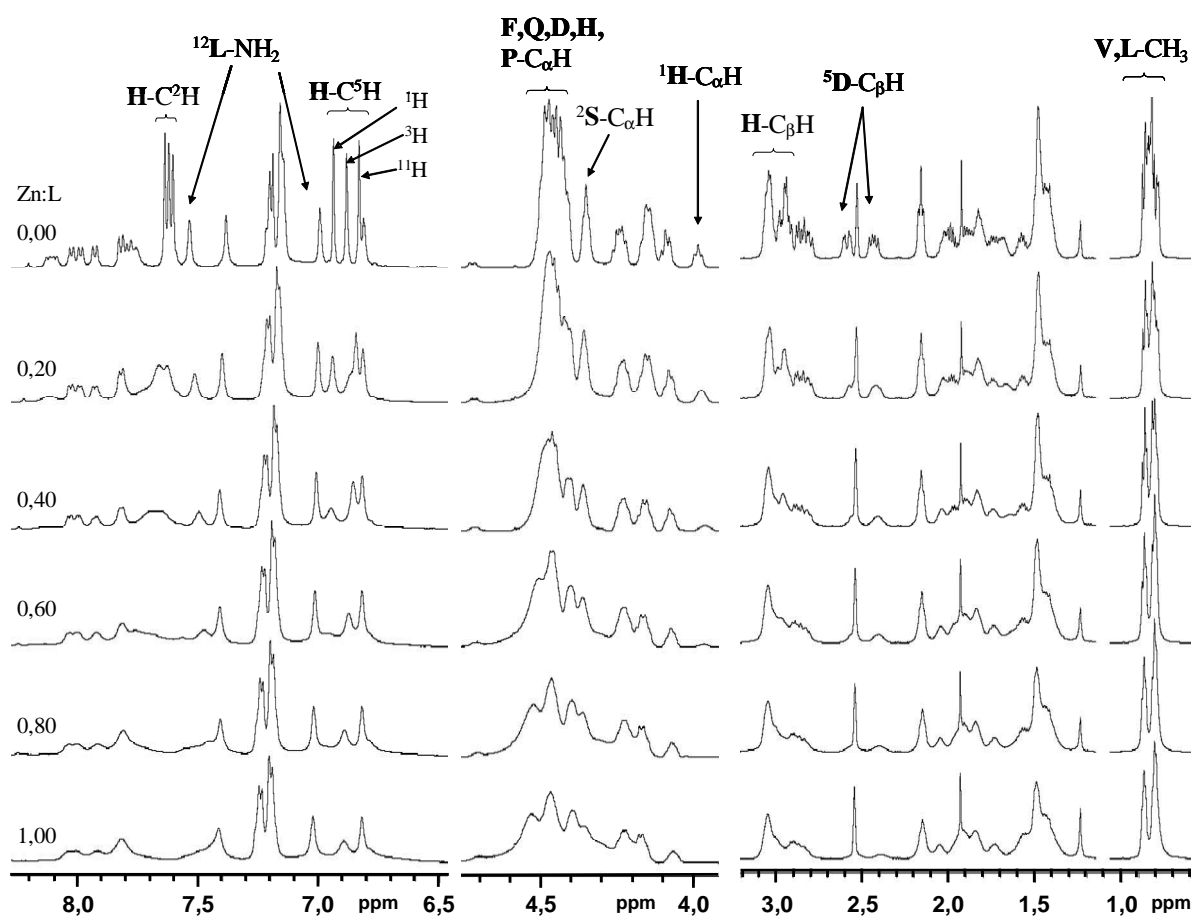
$\text{M}_p\text{H}_q\text{L}_r$	$\log \beta_{\text{pqr}}$	
	$\text{H}_2\text{O}$	DMSO
$[\text{ZnH}_2\text{L}]^{3+}$	17,64(10)	17,64(8)
$[\text{ZnHL}]^{2+}$	11,99(8)	11,6(1)
$[\text{ZnL}]^+$	6,11(5)	5,02(9)
$[\text{ZnH}_{-1}\text{L}]$	-0,89(5)	-3,1(1)
$[\text{ZnH}_{-2}\text{L}]^-$	-	-13,43(6)

**6.2.2. táblázat:** A cink(II)komplexek bruttó stabilitási állandóinak logaritmusa ( $\log \beta_{\text{pqr}}$ ) vízben és DMSO-ban ( $T=298\text{K}$ ,  $I=0,1\text{ M NaCl}$ )



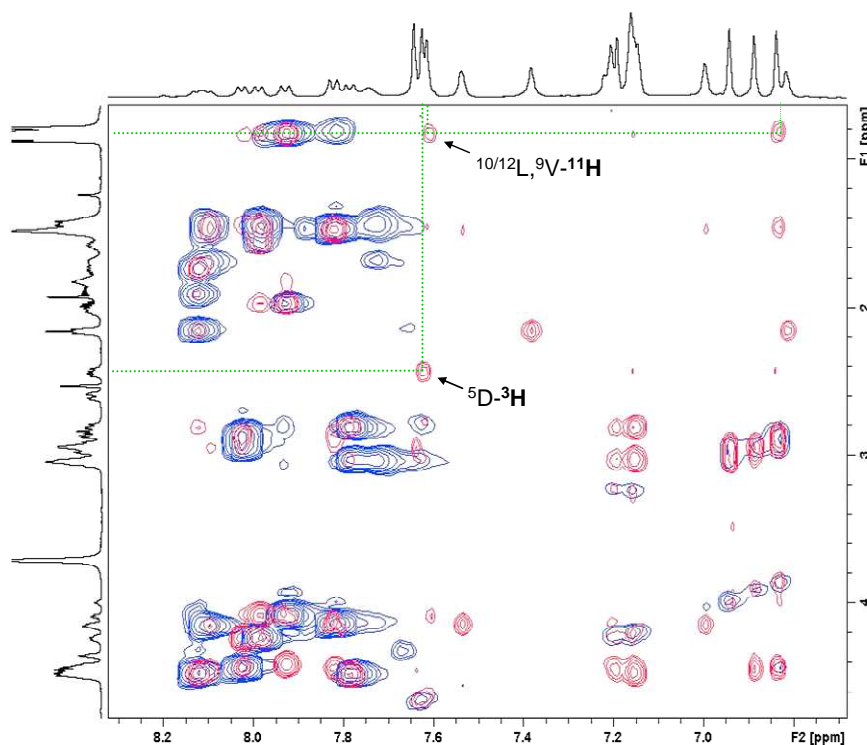
**6.2.1. ábra:** A cink(II)–L rendszerek részecskeeloszlási diagramjai vízben (folyamatos vonal) és 80 (m/m)% DMSO/ $\text{H}_2\text{O}$  elegyben (szaggatott vonal) ( $[\text{L}]_{\text{tot}} = 2 \times [\text{Zn}^{2+}]_{\text{tot}} = 1,0 \times 10^{-3}\text{ M}$ ,  $T=298\text{ K}$ ,  $I=0,1\text{ M NaCl}$ )

Ilyen elegyösszetételnél pH 7-8 között a  $[\text{ZnL}]^+$  részecske uralkodik, melynek kötési sajátosságait pH\* 7,8-nál deuterált DMSO-ban  $^1\text{H}$ -NMR-rel vizsgáltunk (6.2.2.A ábra). A szabad peptid jeleit kétdimenziós COSY, TOCSY és ROESY mérésekkel azonosítottuk. A  $^7\text{Q-C}_\alpha\text{H}$  és a  $^8\text{P-C}_\beta\text{H}_2$  közötti ROESY keresztcsúcs alapján a nyolcadik helyen található prolin *transz* konformációt vesz fel. Az  $^1\text{H}$ ,  $^3\text{H}$  és  $^{11}\text{H}$  egységek és a szomszédos aminosavak közötti ROESY keresztcsúcsok lehetővé teszik az egyes hisztidinekhez tartozó jelek megkülönböztetését is (6.2.2.B ábra). Az egyetlen nemszomszédos aminosavak közötti keresztcsúcs a  $^3\text{H-C}^2\text{H}$  és a  $^5\text{D-C}_\beta\text{H}_2$  jelei között volt megfigyelhető, mely a két oldallánc hidrogénhidas kapcsolatára utal. A cink(II)ion hatására mindegyik aminosav  $^1\text{H}$ -NMR-jele szélesedik, de a három hisztidin  $\text{C}^2\text{H}$  és  $\text{C}^5\text{H}$  protonjai, illetve az aszparaginsav  $\text{C}_\beta\text{H}_2$  jelei nagyobb mértékben szélesednek és tolódnak el, mint a többi (6.2.2.A ábra). Ez a jelenség  $\{\text{NH}_2, 3\text{N}_{\text{im}}, \text{COO}^-\}$  környezetet valószínűsít a ZnL komplexben. A  $^{11}\text{H}$  imidazol koordinálódását támasztja alá a vele szomszédos  $^{12}\text{L-NH}_2$  protonjainak fokozott kiszélesedése is. A cinkkel való kölcsönhatás egész molekulát érintő hatása azt jelzi, hogy a komplex nem rendelkezik szabadon forgó részszel, ami szintén elgondolásunkat erősíti.

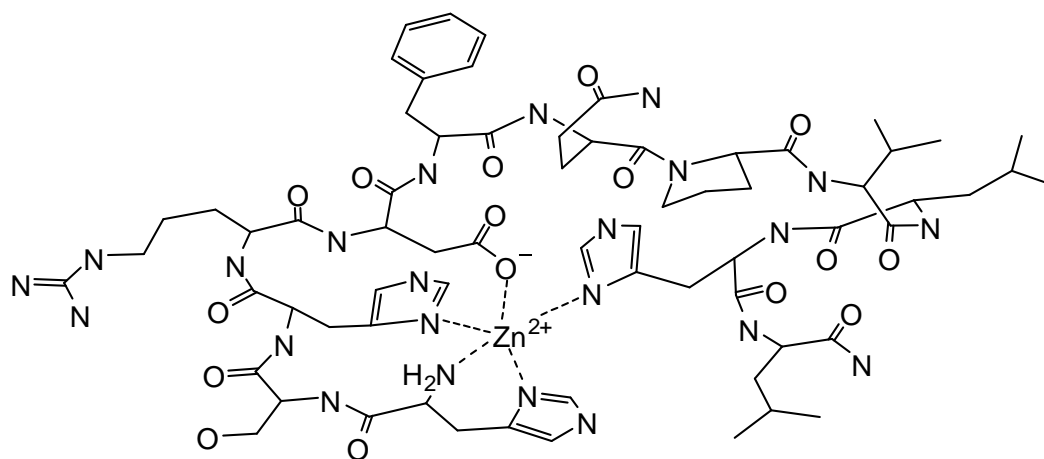


**6.2.2. A ábra:** A ligandum  $^1\text{H}$ -NMR-spektruma cink(II)ionok távol- és jelenlétében pH\* = 7,8-nál DMSO- $\text{d}_6$ -ban ( $[\text{L}]_{\text{tot}} = 5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $T = 298 \text{ K}$ )





**6.2.2. B ábra:** A ligandum kétdimenziós TOCSY (kék) és ROESY (piros) pH\* = 7,8-nál DMSO-d<sub>6</sub>-ban ([L]<sub>tot</sub> = 5 × 10<sup>-3</sup> M, T=298 K)



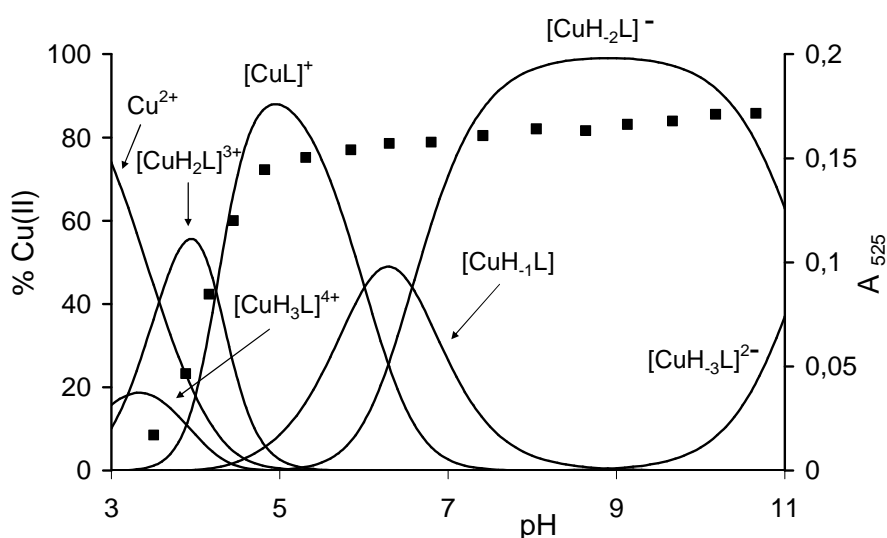
**6.2.3. ábra:** A [ZnL]<sup>+</sup> részecske javasolt szerkezete

Minden bizonnyal a <sup>3</sup>H-<sup>5</sup>D és az <sup>5</sup>D-<sup>11</sup>H oldalláncok közti nagyméretű makrokelátnak tudható be, hogy az {NH<sub>2</sub>, 3N<sub>im</sub>, COO<sup>-</sup>} típusú környezet (6.2.3. ábra) alig jelent stabilizáció növekedést a HVH {NH<sub>2</sub>, 2N<sub>im</sub>} koordinált cink(II)komplexével szemben (Δlog *K* ~ 0,2) [27]. Hasonlóan számos más peptid–cink(II) rendszerhez, a [ZnL(OH)] és [ZnL(OH)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> részecskék vegyes hidroxokomplexek lehetnek [25,154], mivel a cink(II)ion csak ritkán, speciális H<sub>2</sub>N-XH- szekvencia esetén segíti elő az amidnitrogén deprotonálódását [152,153].

### 6.2.3. A HSHRDFQPVLHL-NH<sub>2</sub> (L) peptid kölcsönhatása réz(II)ionokkal

A peptid réz(II)kötő képességét kombinált pH-potenciometria, UV-látható, CD-, <sup>1</sup>H-NMR- és ESR-spektroszkópia módszerekkel tanulmányoztuk 2:1, 1:1 és 1:2 Cu:L arányok mellett. A cinkkel ellentétben az 1:1 és 1:2 arányú rendszerekben az általunk vizsgált pH tartományban végig tiszták maradtak vizes oldataink. Kétszeres fémionfelesleg jelenlétében viszont csapadék vált ki pH 5,5 körül, ami pH 9,0 fölött újra feloldódott. A lúgos közegben képződött vízzeloldható kétmagvú komplexeket spektroszkópiai (UV-látható, CD és ESR) módszerekkel jellemeztük, de a fémionfeleslegnél mért potenciometriás adatok a csapadékképződés széles tartománya miatt nem nyújtottak elegendő információt a rendszer egyensúlyi leírásához. Az egyensúlyi és spektroszkópiai adatok együttes kiértékelése során hat egymagvú komplex létét igazoltuk a Cu:L = 1:2 és 1:1 arányú rendszerekben (6.2.4. ábra, 6.2.3. táblázat). A savas közegben képződő [CuH<sub>3</sub>L]<sup>4+</sup> és [CuH<sub>2</sub>L]<sup>3+</sup> protonált komplexek eloszlásgörbéi meglehetősen átfednek egymással, így csak átlagos spektroszkópiai paramétereiket tudtuk meghatározni.

A kis intenzitású CD-spektrum, a *d-d* átmenetek elnyelési maximuma ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{d-d}} \sim 680 \text{ nm}$ ), és az 1-es komponens spektrum ESR-paraméterei ( $g_{\parallel} = 2,293$ ,  $A_{\parallel} = 163 \text{ G}$ ) leginkább az uralkodó [CuH<sub>2</sub>L]<sup>3+</sup> részecskére jellemző hisztamin-szerű {NH<sub>2</sub>, N<sub>im</sub>} koordinációt sugallják. A {NH<sub>2</sub>, N<sub>im</sub>, 2H<sub>2</sub>O} környezetre számolt szemiempirikus  $\lambda_{\text{max}}^{\text{d-d}} = 681 \text{ nm}$  érték is erre utal [137]. A következő kettő, egymást szintén átfedve követő deprotonálódás az UV-látható, CD- és ESR-spektrumok jellegzetes megváltozását eredményezi, és a fémion körüli ligandumtér növekedését mutatja.

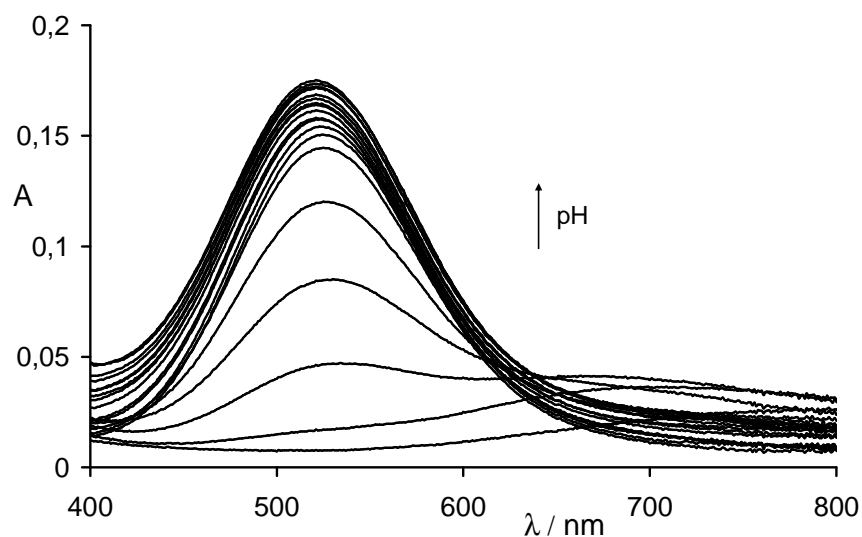


**6.2.4. ábra:** Az ekvimoláris réz(II)–L rendszer részecske-eloszlási diagramja és a látható fény abszorbanciája 525 nm-en (■) a pH függvényében ( $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = [\text{L}]_{\text{tot}} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $T = 298 \text{ K}$ ,  $I = 0,1 \text{ M NaCl}$ )

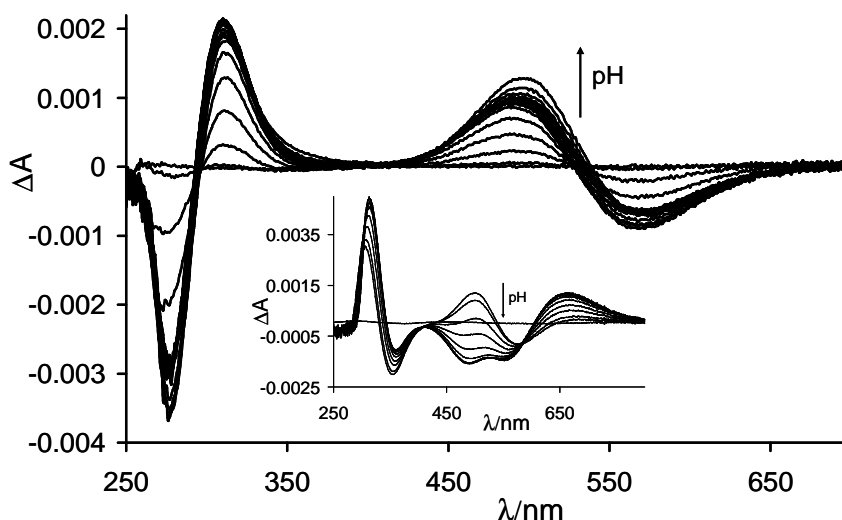
$M_p H_q L_r$	$\log \beta_{pqr}$	VIS		CD	
		$\lambda / \text{nm}$	$\varepsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\lambda / \text{nm}$	$\Delta \varepsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
$[\text{CuH}_3\text{L}]^{4+}$	24,5(1)				
$[\text{CuH}_2\text{L}]^{3+}$	21,30(4)	~ 680	46	—	—
$[\text{CuL}]^+$	12,82(4)	525	103	310	1,189
				490	0,618
				565	-0,604
$[\text{CuH}_1\text{L}]$	6,81(7)	522	101	310	1,317
				492	0,646
				565	-0,528
$[\text{CuH}_2\text{L}]^-$	0,23(6)	522	111	310	1,441
				492	0,650
				565	-0,412
$[\text{CuH}_3\text{L}]^{2-}$	-11,00(7)	522	119	310	1,259
				497	0,873
				570	-0,455

**6.2.3. táblázat:** A réz(II)–L komplexek bruttó stabilitási állandóinak logaritmusa vízben ( $\log \beta_{pqr}$ ), valamint a réz(II)komplexek látható fényelnyelési (VIS) és CD spektroszkópiai paraméterei (T=298 K, I= 0,1 M NaCl).

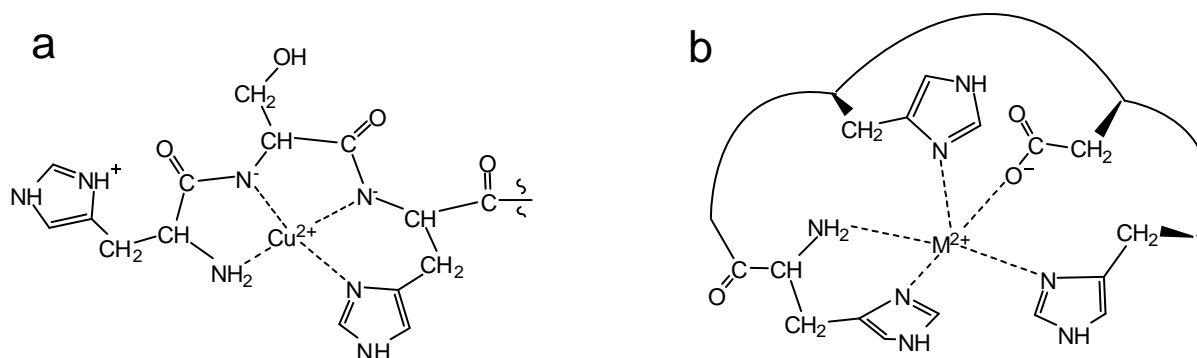
A zárójelben az utolsó értékes jegy hibája látható



**6.2.5. ábra:** A réz(II)–L rendszer látható fényelnyelési spektruma a pH függvényében  
 $([\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = [\text{L}]_{\text{tot}} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ M}, \text{pH} = 3,0\text{--}11,5)$

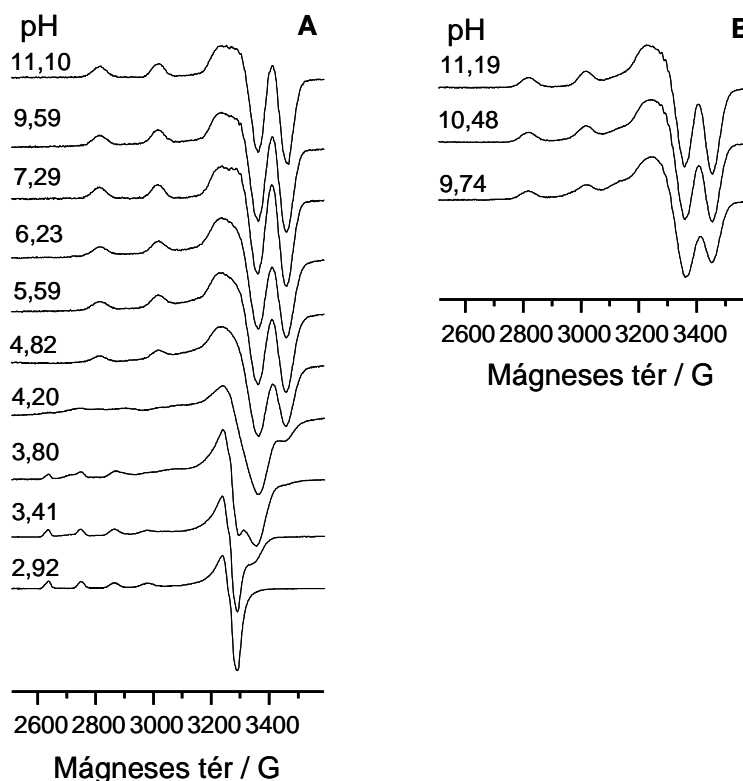


**6.2.6. ábra:** A réz(II)–L rendszerek CD-spektrumai a pH függvényében ( $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = [\text{L}]_{\text{tot}} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ , pH = 3,0–11,5). A beillesztett kép a kétszeres fémfeslegnél mért spektrumokat mutatja. ( $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = 2 \times [\text{L}]_{\text{tot}} = 2,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ , pH = 8,6–11,6)



**6.2.7. ábra:** A  $[\text{CuL}]^+$  komplex albuminszerű (a) és oldalláncok által koordinált (b) izomer szerkezetei

A  $d-d$  átmenetek számottevő kékeltozódása ( $\lambda_{\text{max}}^{d-d} = 525 \text{ nm}$ , 6.2.5. ábra) és az intenzív, közel szimmetrikus CD-couplet megjelenése mind a  $d-d$ , mind az UV tartományban (6.2.6. ábra) a  $[\text{CuL}]^+$  komplex albuminszerű  $\{\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}\}$  kötés módja mellett szól (6.2.7. ábra) [155-158]. A  $[\text{CuH}_1\text{L}]$  és  $[\text{CuH}_2\text{L}]^-$  részecskék UV-Vis és CD spektruma majdnem azonos a  $[\text{CuL}]^+$  komplexével, ami azt jelzi, hogy ez a két deprotonálódás nem befolyásolja a réz(II) koordinációs környezetét. Elképzelésünket támasztja alá, hogy a  $pK_{[\text{CuL}]^+} = 6,01$  és  $pK_{[\text{CuH}_1\text{L}]} = 6,58$  értékek nagyon közeliek a fémion nélküli peptidnél megfigyeltékhez ( $pK = 6,00$  és  $6,55$ ), azonban a pH 5-9,5 között felvett alacsony hőmérsékletű (77 K) ESR-spektrumok csak kettő komponens spektrum (2-es és 3-as) összegeként értékelhetők ki (6.2.8. ábra, 6.2.4. táblázat).



**6.2.8. ábra:** Az ekvimoláris és kétszeres fémionfelesleget tartalmazó réz(II)–L rendszerek 77 K-en felvett anizotróp ESR-spektrumai. (A:  $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = [\text{L}]_{\text{tot}} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ ; B:  $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = 2 \times [\text{L}]_{\text{tot}} = 2,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ )

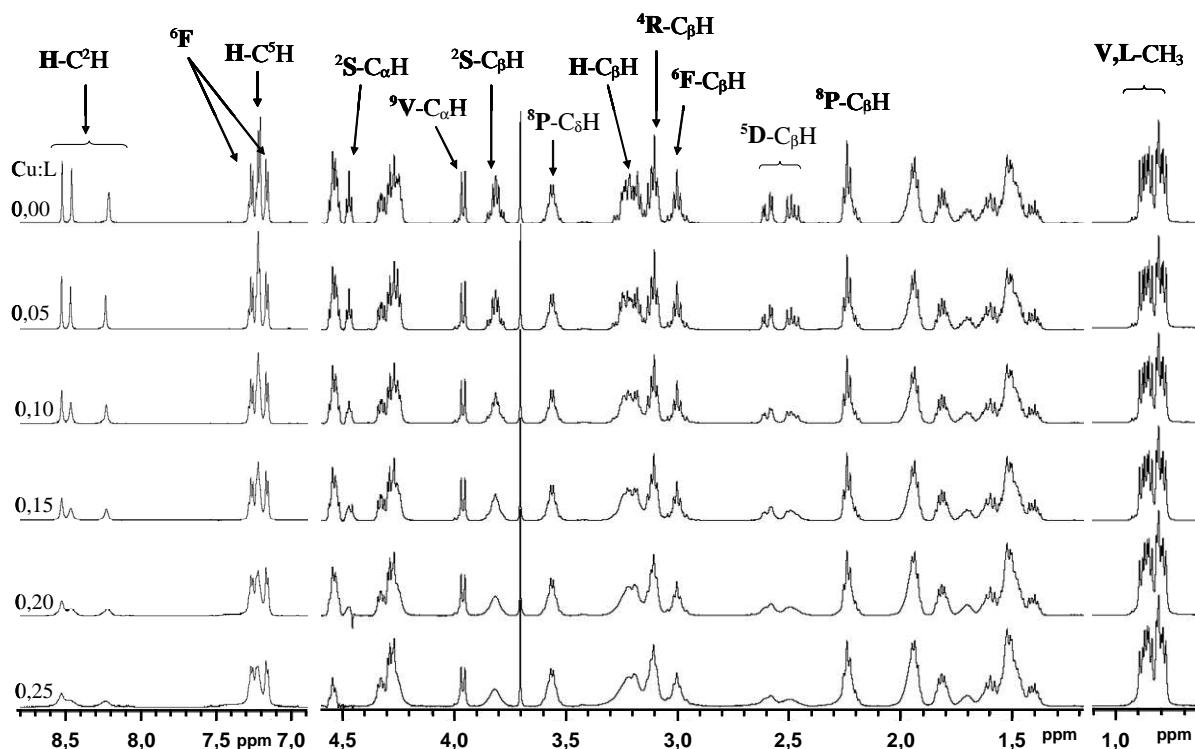
Komponensek	$g_{\parallel}$	$g_{\perp}$	$A_{\parallel}/\text{G}$	$A_{\perp}/\text{G}$	Javasolt koordináció
Komp. 1.	2,293	2,060	163	18	$\{\text{NH}_2, \text{N}_{\text{im}}\}$
Komp. 2.	2,201	2,059	188	24	$\{\text{NH}_2, 3\text{N}_{\text{im}}, \text{COO}^{-}\}$
Komp. 3.	2,175	2,037	200	18	$\{\text{NH}_2, \text{N}^{-}, \text{N}^{-}, \text{N}_{\text{im}}\}$
Komp. 4.	2,210	2,058	175	19	$\{2 \text{ v. } 3\text{N}^{-}, \text{N}_{\text{im}}\}$

**6.2.4. táblázat:** A réz(II)–L rendszer anizotróp komponens ESR-paraméterei

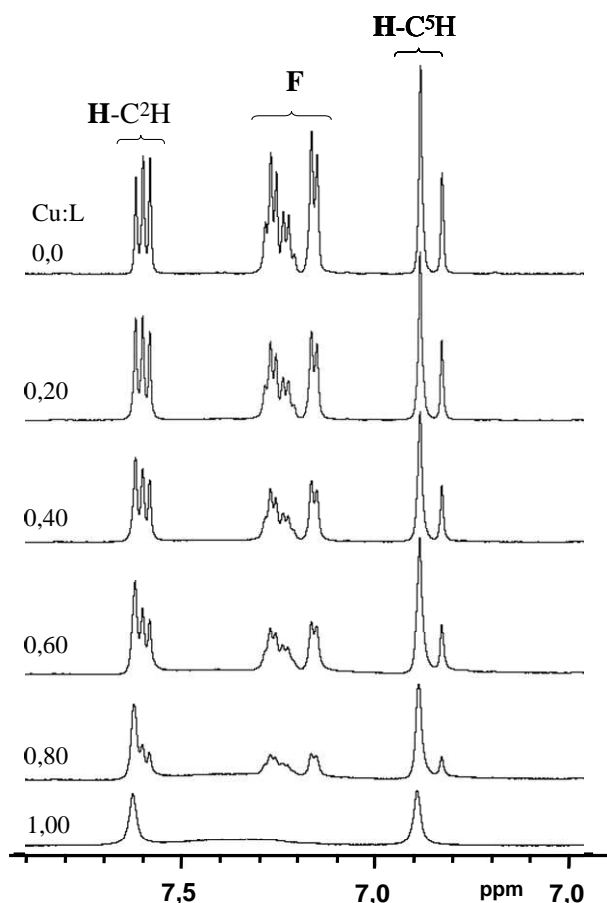
A 3-as komponens ESR-paraméterei ( $g_{\parallel} = 2,175$ ,  $A_{\parallel} = 200 \text{ G}$ ) tipikusak az albuminszerű  $\{\text{NH}_2, \text{N}^{-}, \text{N}^{-}, \text{N}_{\text{im}}\}$  koordinációra, míg a 2-es komponens ( $g_{\parallel} = 2,201$ ,  $A_{\parallel} = 188 \text{ G}$ ) kevésbé erős ligandumteret takar a fémion körül. Utóbbi móltörtje 0,5 pH 5-6 között, és a  $[\text{CuH}_2\text{L}]^{-}$  részecske képződése során nullára csökken. Mivel az ESR-spektrumokat 77 K-en vettük föl,  $^1\text{H}$ -NMR-méréseket is végeztünk annak érdekében, hogy tisztázzuk az izomerek létezését 298 K-en. A réz(II)koncentráció növelésének hatását a peptid  $^1\text{H}$ -NMR-spektrumára pH\* = 5-nél a 6.2.9. ábra szemlélteti. A  $^1\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^5\text{D}$  és  $^{11}\text{H}$  csúcsai szelektíven szélesednek, de a  $^2\text{S}$ ,  $^4\text{R}$ ,  $^6\text{F}$

szomszédos, nem-koordinálódó aminosavak jeleit is érinti a hatás. A  $^8\text{P}$ ,  $^9\text{V}$ ,  $^{10/12}\text{L}$  aminosavak alifás protonjainak a jelei viszont változatlanok.

Az albuminszerű  $\{\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}\}$  koordinált komplexben a fémionhoz az N-terminális felőli három aminosav kötődik, és a  $[\text{CuL}]^+$ -re meghatározott  $d-d$  átmenetek  $\lambda_{\text{max}}^{\text{d-d}} = 525 \text{ nm}$  értéke kizárja a távoli hisztidin erős axiális kölcsönhatását (6.2.7. ábra, **a**). A  $^1\text{H}$  jeleinek a réz(II)ion párosítatlan elektronja okozta szelektív szélesedése ennek következtében egy koordinációs izomer létét bizonyítja. A legvalószínűbb a  $\{\text{NH}_2, 3\text{N}_{\text{im}}, \text{COO}^-\}$  kötőmód (6.2.7. ábra, **b**), mely összhangban van a 2-es komponensre meghatározott ESR-paraméterekkel. A réz(II)ion párosítatlan elektronja  $\text{pH}^* = 9$ -nél is komoly hatással van a  $^1\text{H}$ -NMR-spektrumra (6.2.10. ábra). Az N-terminális első hét aminosav jelei – beleértve a  $^6\text{F}$  aromás hidrogénjeit is – nagymértékben szélesednek, de az egyik hisztidin egységhez (feltehetőleg a  $^1\text{H}$ -hez) tartozó rezonanciára a Cu(II) alig gyakorol befolyást. Mindez arra enged következtetni, hogy míg  $\text{pH} 7$  alatt a hisztidingazdag peptid oldallánci donoratombjai versenyezni képesek az albuminszerű koordinációval, addig lúgos közegben a sokkal stabilabb amidkoordinált  $\{\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}\}$  kötőmód a kedvezményezett. Fontos megjegyezni, hogy a  $\text{pH} 5-9$  között rögzített UV-látható spektrumok az albumin típusú koordinációt jelzik, azaz  $298 \text{ K}$ -en az  $\{\text{NH}_2, 3\text{N}_{\text{im}}, \text{COO}^-\}$  környezetű izomer csupán néhány százalékban fordul elő, de koncentrációja  $77 \text{ K}$ -en kétség kívül nagyobb.



**6.2.9. ábra:** A ligandum  $^1\text{H}$ -NMR-spektruma réz(II)ionok távol- és jelenlétében  $\text{pH}^* = 5,0$ -nél  $\text{D}_2\text{O}$ -ban ( $[\text{L}]_{\text{tot}} = 5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $T = 298 \text{ K}$ )



**6.2.10. ábra:** A ligandum C<sup>2</sup>H és C<sup>5</sup>H imidazol protonjainak <sup>1</sup>H-NMR-jelei a réz(II)ion távol- és jelenlétében pH\* = 9,0-nél D<sub>2</sub>O-ban ([L]<sub>tot</sub> = 5 × 10<sup>-3</sup> M, T = 298 K)

Az utolsó deprotonálódási folyamat ( $[\text{CuH}_2\text{L}]^- = [\text{CuH}_3\text{L}]^{2-} + \text{H}^+$ , pK = 11,23), mely elhanyagolható változást okoz a spektroszkópai paraméterekben, a fémionhoz koordinált <sup>3</sup>H imidazol „pirrolos” <sup>1</sup>NH deprotonálódásának tudható be. Ezt a jelenséget korábban már számos albuminszerű peptidnél megfigyelték [156,157,159].

Az endostatin N-terminális fragmensének igen nagy a rézaffinitása, melyet a látszólagos disszociációs állandó ( $K_D$ ) kiszámolásával bizonyíthatunk pH = 7,4-nél 1:1 Cu:L aránynál az alábbiak alapján:

$$[\text{CuH}_q\text{L}]^{q+1} = [\text{H}_q\text{L}]^{q-1} + \text{Cu}^{2+}_{\text{szabad}}, \quad K_D = [\text{H}_q\text{L}]^{q-1} \times [\text{Cu}^{2+}_{\text{szabad}}] / [\text{CuH}_q\text{L}]^{q+1}$$

ahol  $[\text{H}_q\text{L}]^{q-1}$  és  $[\text{CuH}_q\text{L}]^{q+1}$  a szabad peptid, illetőleg a komplexek teljes koncentrációját jelölik, magukba foglalva minden protonáltsági állapotot. A 6.2.1. és 6.2.3. táblázatokban ismertetett egyensúlyi adatok felhasználásával kiszámolható, hogy esetünkben  $K_D = 2,6 \times 10^{-15}$  M. Ez jóval kisebb, mint a közelmúltban meghatározott réz(II)–HSA kölcsönhatást jellemző

$K_D=1,0 \times 10^{-12}$  M érték [160], illetve hasonló mai napig a legerősebb rézkötő peptidként számontartott, emberi protamin N-terminális fragmens kölcsönhatásához ( $K_D=3,3 \times 10^{-15}$  M) [154]. Mivel a réz(II) kofaktorként alapvető szerepet játszik az érképződésben, a fenti megállapításunk azt sejteti, hogy az endostatin biológiai aktivitásának kifejtésében szerepet játszhat a réz(II)hez való kötődés.

Az ATCUN motívumtól távoli hisztidin lehetőséget teremt arra, hogy a ligandum két réz(II)iont is megkössön, s pH 9 felett, kétszeres fémfélesleg esetén vízdoldható, kétmagvú komplexek képződnek. A 2:1 Cu:L arányú rendszer pH 9 után felvett CD-spektrumai jelentősen eltérnek az 1:1 arányú rendszerben mértektől, ami új, amidnitrogént tartalmazó fémkötő hely léteire utal. A pH 10-11 között rögzített ESR-eredmények két elkülönülő réz(II) központra utalnak. Az egyik a 3-as komponenssel azonos paraméterekkel rendelkezik, és albuminszerű  $\{NH_2, N^-, N^-, N_{im}\}$  koordináció rendelhető hozzá. A másik réz(II)központ a 4-es komponenssel írható le, és valamivel kisebb ligandumtér jellemzi. Valószínűleg a  $^{11}H$  imidazol horgonycsoportként további 2-3 amidnitrogén deprotonálódását segíti elő, melynek révén  $\{2 \text{ vagy } 3N^-, N_{im}\}$  környezet veszi körül a második réz(II)iont.



### 6.3. A Ni-SOD enzimek szerkezeti és működési modellezése

Bár az elmúlt néhány évben számos publikáció született a Ni-SOD enzimek modelljeinek tekinthető Ni(II)–peptid rendszerek vizsgálatáról (lásd az irodalmi áttekintés 3.4. fejezetét), egyensúlyi és részletes oldatszerkezeti vizsgálatok mindeddig nem születtek, ezért részletesen vizsgáltuk a HCDLPCG–NH<sub>2</sub> peptid nikkel(II) komplexeinek oldatkémiai sajátosságait.

#### 6.3.1. A HCDLPCG–NH<sub>2</sub> peptid protonálódási viszonyai

A peptid–fémion rendszerek vizsgálata előtt a ligandum sav-bázis egyensúlyait tanulmányoztuk. A ligandum öt olyan donorcsoporttal rendelkezik, mely a pH 2–11 tartományban (de)protonálódásra képes (NH<sub>2</sub>, His, Asp, 2 Cys; [H<sub>5</sub>L]<sup>2+</sup> ↔ [L]<sup>3–</sup>). A meghatározott pK<sub>pqr</sub> értékek (6.1.1. táblázat) nagyon hasonlóak más hisztidin és cisztein tartalmú peptidekéhez [36, endostatin], így jó közelítéssel az első deprotonálódás az aszparaginsav karboxilcsoportjához, a második és harmadik az N-terminális hisztidin imidazol és aminocsoportjához, míg az utolsó két átfedő deprotonálódás a tiolcsoportokhoz rendelhető. A tiolcsoportok oxidációjának megakadályozása érdekében argon gázt buborékolattunk át intenzíven oldatainkon.

H <sub>q</sub> L <sub>r</sub>	logβ <sub>pqr</sub>	pK <sub>pqr</sub>
[H <sub>5</sub> L] <sup>2+</sup>	33,84(3)	3,54
[H <sub>4</sub> L] <sup>+</sup>	30,30(2)	5,52
[H <sub>3</sub> L]	24,78(2)	7,30
[H <sub>2</sub> L] <sup>–</sup>	17,48(2)	8,36
[HL] <sup>2–</sup>	9,12(2)	9,12

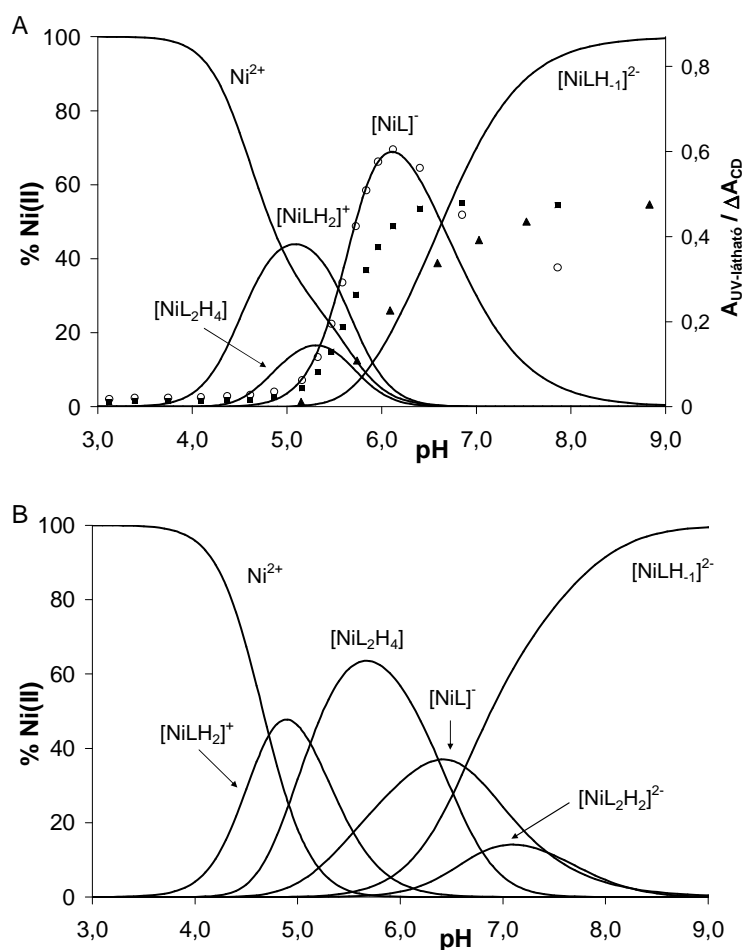
**6.3.1. táblázat:** A HCDLPCG–NH<sub>2</sub> protonkomplexek bruttó stabilitási állandóinak logaritmusai (logβ<sub>pqr</sub>) és pK<sub>pqr</sub> értékei (p = 0) vizes közegben (T = 298K, I = 0,1 M NaCl). A zárójelben az utolsó értékes jegy hibája látható

#### 6.3.2. A HCDLPCG–NH<sub>2</sub> peptid kölcsönhatása nikkel(II)ionokkal

A nikkel(II)–peptid rendszerekben lejátszódó komplexképződési egyensúlyi folyamatokat pH-potenciometriás titrálások, UV-látható, CD- és NMR-spektroszkópiai vizsgálatok segítségével követtük nyomon. Az egyensúlyi és spektroszkópiai adatok együttes kiértékelése során öt egymagvú komplex létét igazoltuk az Ni:L = 1:1 és 1:2 arányú rendszerekben (6.3.1. ábra). A bruttó stabilitási állandókat és a spektroszkópiai adatokat a 6.3.2. táblázat foglalja össze.

$M_p H_q L_r$	$\log \beta_{pqr}$	VIS		CD	
		$\lambda / \text{nm}$	$\varepsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\lambda / \text{nm}$	$\Delta \varepsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
NiH <sub>2</sub> L	24,03(6)				
NiL	12,95(4)	464	237	324	2,193
				460	0,909
				544	−0,712
NiH <sub>1</sub> L	6,31(5)	470	228	332	2,37
				470	2,08
				540	−1,533
NiH <sub>4</sub> L <sub>2</sub>	47,50(5)				
NiH <sub>2</sub> L <sub>2</sub>	33,90(8)				

**6.3.2. táblázat:** A nikkell(II)komplexek bruttó stabilitási állandóinak logaritmusa vízben ( $\log \beta_{pqr}$ ), valamint a látható fényelnyelési (VIS) és CD-spektroszkópiai paraméterei (T=298 K, I=0,1 M NaCl). A zárójelben az utolsó értékes jegy hibája látható



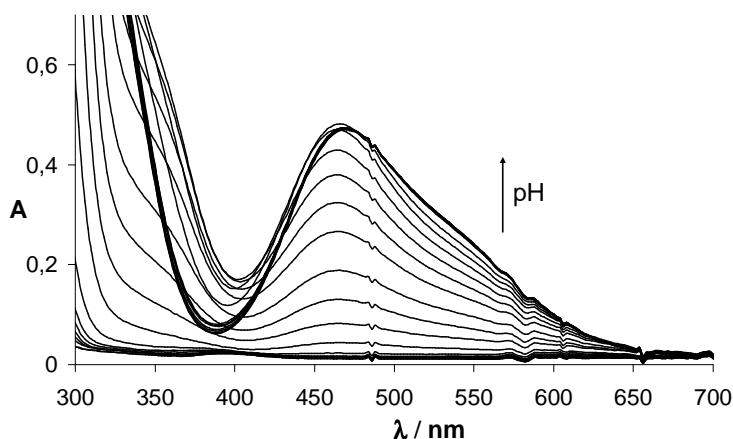
**6.3.1. ábra:** A nikkell(II)–L rendszer 1:1 arányú (A) és 1:2 arányú (B) részecskeeloszlási diagramja. Az (A) ábrán a 470 nm-en mérhető CD értékek 200-szorosa ( $\blacktriangle$ ), valamint a 354 és 470 nm hullámhosszú fény elnyelése ( $\circ$  és  $\blacksquare$ ) is látható. ( $[L]_{tot} = 1,0 \times 10^{-3}$  M, T=298 K, I=0,1 M NaCl)

Az ekvimoláris és ligandumfelesleget tartalmazó oldatokban pH 4-6 között az  $[\text{NiLH}_2]^+$  és  $[\text{NiL}_2\text{H}_4]$  komplexek képződnek. Mivel az N-terminális hisztidint tartalmazó peptideknél a nikkell(II)ion esetében a rézhez és cinkhez hasonlóan kedvező a hisztamin és biszhisztamin típusú koordináció, kézenfekvő ezek kialakulása e részecskékben. Ezt a feltételezésünket támasztja alá a heptapeptid  $\text{Ni}^{2+} + [\text{H}_2\text{L}]^- = [\text{NiH}_2\text{L}]^+$  valamint az  $[\text{NiH}_2\text{L}]^+ + [\text{H}_2\text{L}]^- = [\text{NiH}_4\text{L}_2]$  egyensúlyi folyamatokra felírt állandóinak ( $\log K = 6,75$  és  $5,62$ ) közelsége a His-Gly  $\text{Ni}^{2+} + [\text{L}']^- = [\text{NiL}']^+$  valamint  $[\text{NiL}']^+ + [\text{L}']^- = [\text{NiL}_2]$  egyensúlyi állandóihoz ( $\log K = 6,81$  és  $5,49$ ). A His-Gly esetében ugyanis kizárólag a hisztamin/biszhisztamin típusú kötőmód valósul meg [32]. Minthogy e komplexek látható spektrumai ( $d-d$  átmenetei) igen kis intenzitásúak, nagy valószínűséggel oktaédres szerkezettel rendelkeznek.

Az  $[\text{NiL}]^-$  törzskomplex képződése pH  $\sim 5$ -nél indul, s vele párhuzamosan növekszik a  $\sim 470$  nm abszorpciós maximummal jellemezhető elnyelési sáv is (6.3.1.A ábra, ■ és 6.3.2. ábra). Minthogy nikkell(II)komplexek esetén a  $\lambda_{\text{max}} \sim 450\text{-}540$  nm környékén megjelenő viszonylag intenzív sávok csak a síknégyszetes szerkezet  $d-d$  átmeneteihez tartozhatnak [161], az  $[\text{NiL}]^-$  részecskéhez is ez a geometria rendelhető. A 470 nm-hez tartozó abszorbanciát a pH-függvényében ábrázolva (6.3.1.A ábra, ■) jól látható, hogy a síknégyszetes szerkezet pH 6,5-re teljesen kialakul. Ugyanakkor a  $d-d$  átmenethez rendelhető CD-intenzitás csak pH 8-9-re, az  $[\text{NiH}_1\text{L}]^{2-}$  komplex kialakulásával párhuzamosan fejlődik ki teljesen (6.3.1A ábra, ▲). Minthogy a királis perturbáció döntően az amidnitrogén koordinációja révén adódik át a fémionra, a CD spektrumok mikrodeprotonálódási folyamatra utalnak, azaz a pH 6,5-nél maximumot mutató  $[\text{NiL}]^-$  részecskéhez két izomer szerkezet rendelhető: az egyikben még nincs, a másikban már megjelenik amidnitrogén koordinációja. Ennek megfelelően a két izomerhez  $\{\text{NH}_2, \text{N}_{\text{im}}, \text{S}^-, \text{S}^-\}$  és  $\{\text{N}_{\text{im}}/\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S}^-, \text{H}_2\text{O}\}$  típusú kötőmód rendelhető. Adataink alapján nehéz eldönteni, hogy az utóbbi komplexben az imidazol vagy az amino nitrogén koordinálódik-e. Az UV-látható spektrumon 354 nm környékén (6.3.2. ábra) egy az  $[\text{NiL}]^-$  komplexhez rendelhető (6.3.1.A ábra, ○) váll alakul ki. E sáv intenzitásának csökkenése pH 6 felett utalhat a komplex átalakulása során fellépő geometriai változásra, de arra is, hogy az  $[\text{NiL}]^-$  komplexben olyan donorcsoport koordinálódik a fémionhoz, ami magasabb pH-n kiszorul a koordinációs szférából. Utóbbi megfontolás alapján elképzelhető, hogy a váll az  $\text{N}_{\text{im}} \rightarrow \text{Ni}^{2+}$  töltésátvitelhez rendelhető. Megerősítheti ezt a feltételezést az a megfigyelés, hogy az N-terminális szabad hisztidint tartalmazó peptidek nikkell(II)komplexeinél az imidazolgyűrű szerepel horgonydonor-csoportként az amidnitrogén koordinációja során [162]. Magasabb pH-n az imidazolgyűrű kiszorul a koordinációs szférából, s az  $[\text{NiH}_1\text{L}]^{2-}$  komplexben már az enzimre jellemző  $\{\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S}^-, \text{S}^-\}$  kötőmód valósul meg. Ezt számos hasonló modellvegyület spektro-

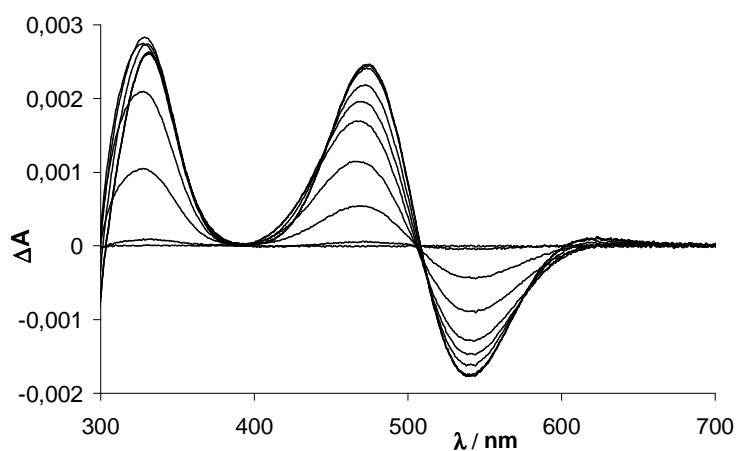
szkópiái paraméterei [120-125,127] és az enzim CD-spektruma [163] is alátámasztja. A CD-spektrumokon 330 nm körül megjelenő abszorpciós maximum (6.3.3. ábra) több közlemény szerint a  $S^- \rightarrow Ni^{2+}$  átmenethez rendelhető [36,37,161,164-167].

Az aktív centrumra jellemző szerkezet tehát a peptidünk esetén is kialakul (6.3.4. ábra), ekkor már annak fémion affinitása ( $K_D = 2,0 \times 10^{-15}$  M) jelentősnek mondható, csak hogy mindez a Ni-SOD enzimnél 4-5 egységgel alacsonyabb pH-n valósul meg. Ennek oka az enzim szerkezetében keresendő. A hat monomer alegység kölcsönhatásának következtében a fémion környezetét, így a két koordinálódó cisztein közötti makrokelátot is számos hidrogénhíd stabilizálja [118,119]. Bár ezek a hidrogénhidás kölcsönhatások nyilvánvalóak a kristályszerkezet alapján, jelentőségüket csak az ilyen kölcsönhatásokat nélkülöző modellrendszerünk vizsgálata teszi kézzelfoghatóvá.



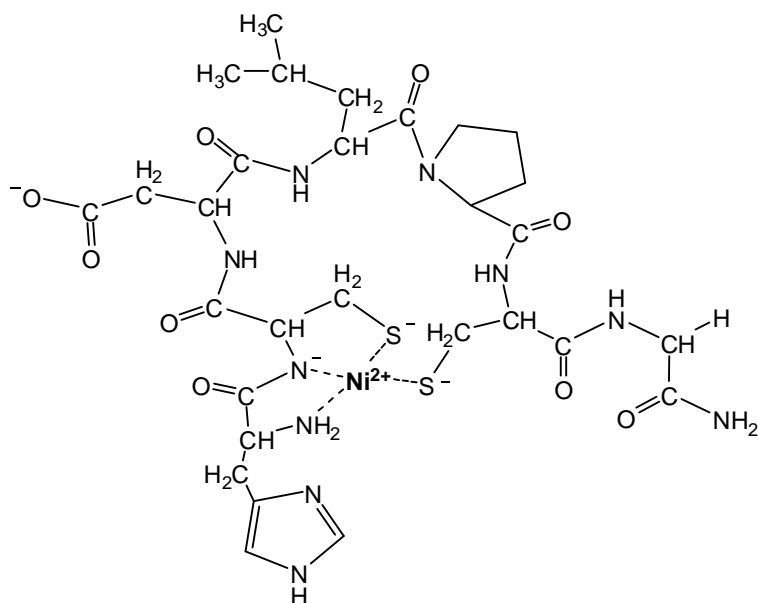
**6.3.2. ábra:** Az 1:1 arányú nikkel(II)–L rendszerek látható fényelnyelési spektrumai a pH függvényében

$$([Ni^{2+}]_{tot} = [L]_{tot} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ M, pH} = 2,8-10,9)$$



**6.3.3. ábra:** Az 1:1 arányú nikkel(II)–L rendszer CD-spektrumai a pH függvényében

$$([Ni^{2+}]_{tot} = [L]_{tot} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ M, pH} = 4,2-11,1)$$

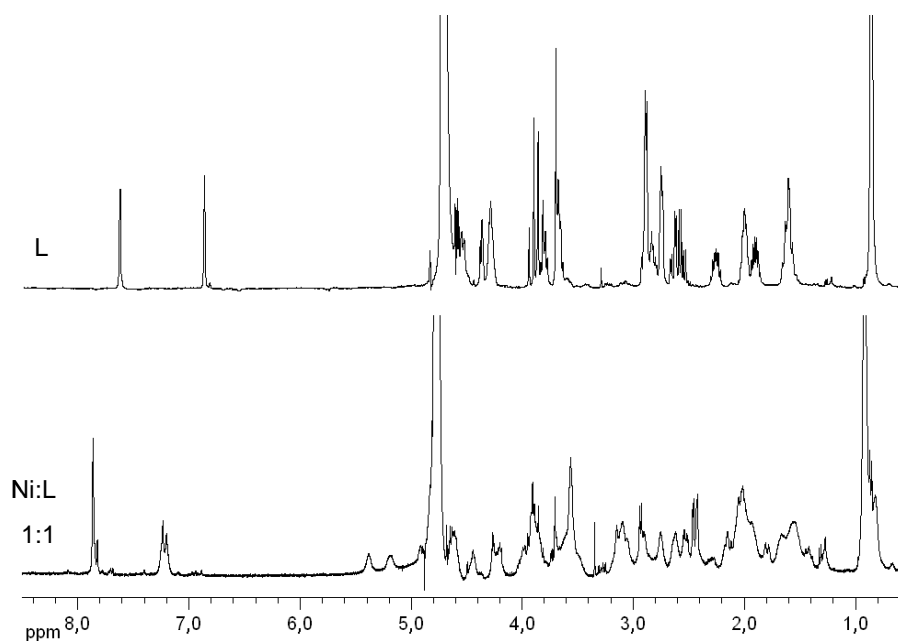


**6.3.4. ábra:** Az  $[\text{NiH}_1\text{L}]^{2-}$  részecske javasolt szerkezete

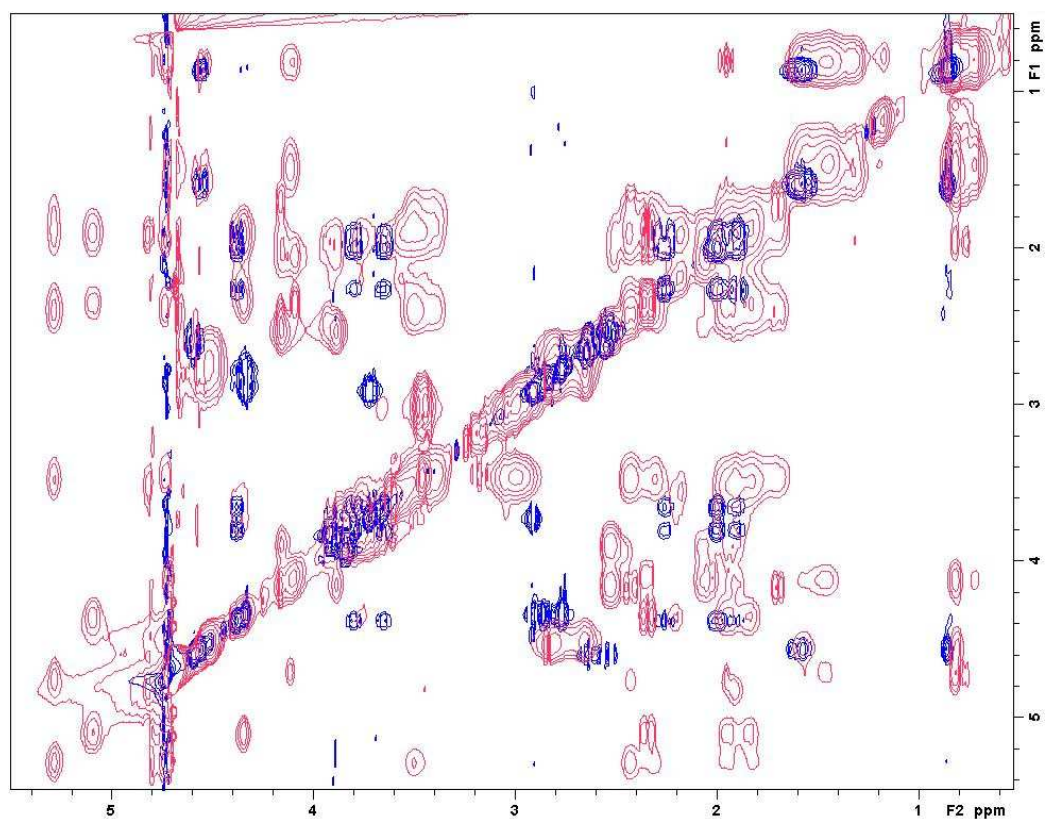
Az  $[\text{NiH}_1\text{L}]^{2-}$  komplexben előforduló kötési mód alaposabb megismerése, illetve a komplexben és az enzim aktív központjában előforduló szerkezet összehasonlítása érdekében NMR-vizsgálatokat végeztünk, amit megkönnyített a komplex diamágneses sajátsága. A ligandum NMR-jeleinek hozzárendelése a 45. oldalon található.

A  $\text{Ni}:\text{L} = 1:1$  arányú rendszer pH\* 9-nél,  $\text{D}_2\text{O}$ -ban mért NMR-spektrumában (6.3.5., 6.3.6. és 6.3.7. ábrák) megjelenő jelek teljes hozzárendelése a spektrum bonyolultsága, a jelek jelentős átfedése miatt a dolgozat elkészítésekor még nem valósult meg. Talán a részletek ismerete nélkül is látható, hogy a komplex jelenlétében az NMR-csúcsok száma megnő és a jelek jelentősen kiszélesednek. Ez alapvetően különbözik az N-terminális nonapeptid vizsgálatok tapasztaltaktól [120], ugyanis a szerzők szerint a peptid és nikkell(II)komplexének NMR-spektruma tökéletesen azonos. Minthogy az  $[\text{NiH}_1\text{L}]^{2-}$  komplex diamágneses sajátságú, a jelek kiszélesedése cserefolyamatokkal magyarázható. Az NMR-jelek még nem végleges hozzárendelése szerint az 5,1 és 5,3 ppm-nél megjelenő új csúcsok (6.3.6. ábra) a cisztein és prolin alegységekhez rendelhetőek. A NOESY-spektrumon az új jelekhez tartozó pozitív előjelű, azaz kémiai cserére utaló keresztcsúcsok is megjelennek (6.3.7. ábra). Mindez arra utal, hogy a prolin alegység peptidkötését érintő *cisz-transz* izomerek képződnek az oldatban.

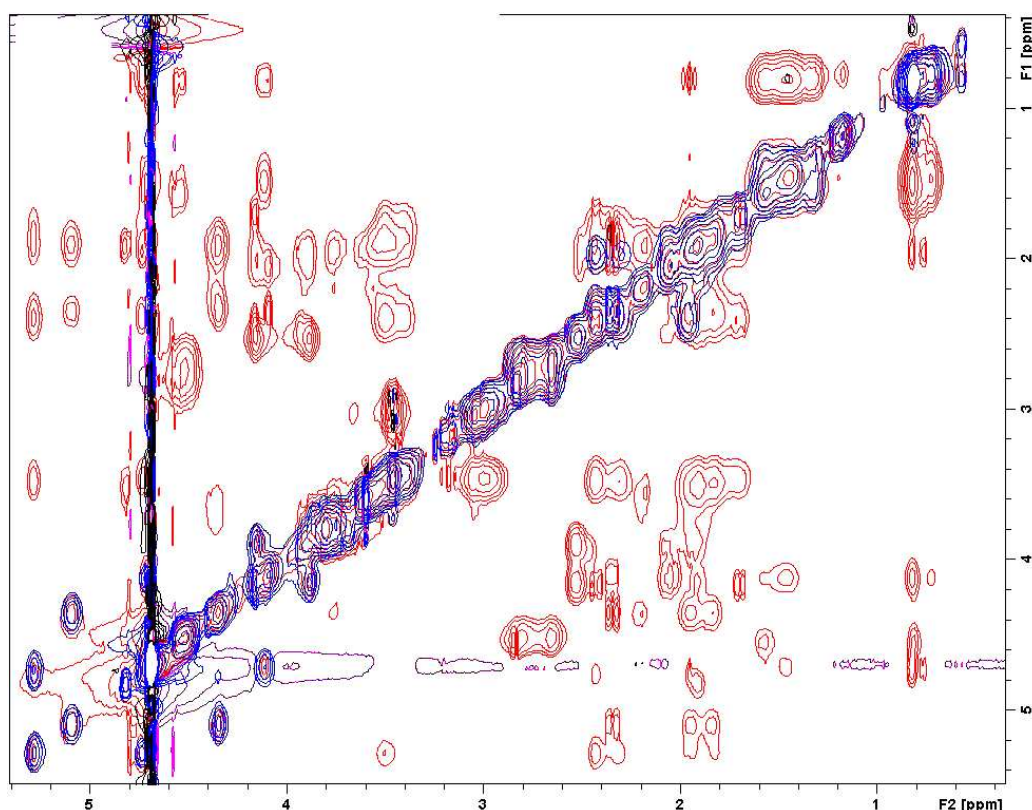
A prolin amidkötésének *cisz* geometriája tehát modellpeptidünk esetén is megjelenik, de a két koordinálódó tiolátot összekötő makrokelátot az enzimben stabilizáló H-hidak hiányában a *cisz* geometria nem kizárólagos.



**6.3.5. ábra:** A HCDLPCG-NH<sub>2</sub> peptid <sup>1</sup>H-NMR-spektruma nikkel(II)ion távol és jelenlétében  
 ([L]<sub>tot</sub> = 5,0×10<sup>-3</sup> M, D<sub>2</sub>O, pH\* = 9,0)



**6.3.6. ábra:** A HCDLPCG-NH<sub>2</sub> peptid (kék) és az [NiH<sub>-1</sub>L]<sup>2-</sup> komplex (bordó) TOCSY-spektruma  
 ([L]<sub>tot</sub> = 5,0×10<sup>-3</sup> M, D<sub>2</sub>O)

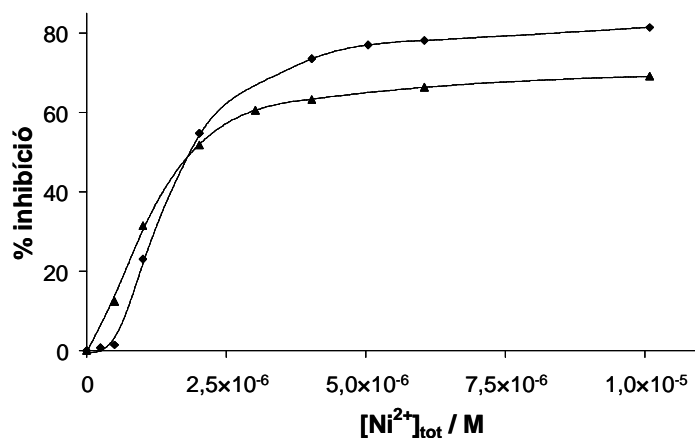


**6.3.7. ábra:** Az  $[\text{NiH}_1\text{L}]^{2-}$  komplex TOCSY- (piros) és NOESY-spektruma (kék) ( $[\text{L}]_{\text{tot}} = 5,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ )

### 6.3.3. A nikkell(II)–HCDLPCG- $\text{NH}_2$ rendszer szuperoxid-dizmutáz aktivitása

Mivel célunk a Ni-SOD enzimek aktív központjának funkcionális modellezése is volt, meghatároztuk az  $\text{Ni:L} = 1:1$  arányú rendszer szuperoxid-dizmutáz aktivitását. Az eredményt a 6.3.8. ábra mutatja be. A rendszer  $\text{IC}_{50}$  értéke  $\text{pH} = 7,0$ -nél és  $\text{pH} = 8,0$ -nál is  $1,9 \times 10^{-6} \text{ M}$ . Eszerint az  $[\text{NiL}]^-$  és  $[\text{NiH}_1\text{L}]^{2-}$  részecskékhez rendelhető aktivitás közel azonos, és kiemelkedőnek mondható a nikkell(II)komplexek körében, különösen ha figyelembe vesszük, hogy önmagában sem a peptid sem a nikkell-akvakomplex nem rendelkezik SOD-utánozó hatással. (Az általunk mért értékek hasonlóak az irodalmi áttekintés 3.4. fejezetében már említett N-terminális modellrendszerekre meghatározott  $\text{IC}_{50}$  értékekhez [120,125].)

$\text{pH} 8$ -nál a nikkell–peptid komplex SOD-aktivitása kb. 2 %-a a natív enzimének ( $\text{IC}_{50} = 1,0 \times 10^{-8} \text{ M}$  [120]). Bár ennek több oka is lehet, a modellkomplex és az enzim közötti legnyilvánvalóbb funkcionális különbség a fémion környezetének eltérő szerkezetében (a *cisz* geometria nem kizárólagos), illetve a Tyr9 fenolos hidroxilcsoport a szubsztrát megkötődését irányító/stabilizáló hatásának [119,120] hiányában keresendő.



**6.3.8. ábra:** Az NBT szuperoxid gyök általi redukciójának gátlása a nikkel(II)–HCDLPCG-NH<sub>2</sub> rendszer révén pH = 7,0-nél (◆) és pH = 8,0-nál (▲). A mérés pontossága  $\pm 5$  %



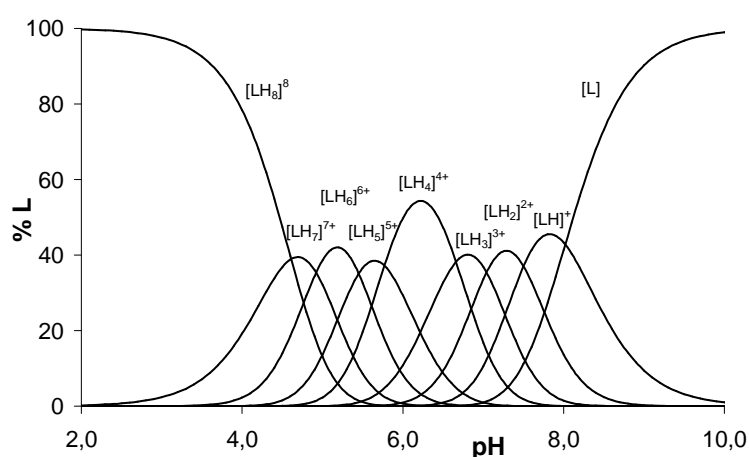
## 6.4. Egy elágazó láncú peptid fémkötő tulajdonságainak vizsgálata

### 6.4.1. A (His)<sub>4</sub>-(Lys)<sub>2</sub>-Lys-CONH<sub>2</sub> peptid protonálódási viszonyai

Először a ligandum lépcsőzetes disszociációs állandóit ( $pK_{\text{pqr}}$ ) határoztuk meg pH-potenciometriás mérések alapján vizes közegben, állandó ionerősség ( $I = 0,1 \text{ M NaClO}_4$ ) mellett. Az oldatokhoz feleslegben adott perklórsav miatt a titrálás kezdetén a ligandum teljesen protonált,  $[\text{H}_8\text{L}]^{8+}$  formában van jelen. Az erős sav semlegesítése után pH 4-6 ill. 6-8 között két puffertelt tartomány jelenik meg a titrálási görbén. A normált görbéken (6.4.2. ábra) látszik, hogy a peptide nézve lépcsőnként négy ekvivalens NaOH fogy. Mindkét puffertelt szakasz a ligandum 4-4 donorcsoportja deprotonálódási folyamatainak tulajdonítható. A hisztidin-imidazolgyűrűk és az aminocsoportok deprotonálódási folyamatai igen átfedőek, ezért a 6.4.1. táblázatban feltüntetett makroszkópikus állandókat és  $pK_{\text{pqr}}$  értékeket nem lehet egyértelműen egyedi donorcsoportokhoz rendelni. Az irodalmi adatok ismeretében ( $pK_{\text{amino}} \sim 7,5$  és  $pK_{\text{im}} \sim 5,5$  [149,168]) viszont feltételezhető, hogy a két lépcső a 4-4 azonos típusú donorcsoportnak tulajdonítható, és az imidazolnitrogének (de)protonálódása játszódik le kisebb pH-n. pH~9-ig mind a nyolc proton eltávozik a ligandumról és további deprotonálódás nem figyelhető meg a közeg lúgosítása során.

A titrálási adatokból számolt bruttó protonálódási állandók segítségével megszerkesztettük az eltérő mértékben protonált részecskék eloszlási görbéit a pH függvényében (6.4.1. táblázat és ábra).

$\text{H}_q\text{L}_r$	$\log\beta_{\text{pqr}}$	$pK_{\text{pqr}}$
$[\text{LH}]^+$	8,02(1)	8,02
$[\text{LH}_2]^{2+}$	15,52(1)	7,5
$[\text{LH}_3]^{3+}$	22,56(1)	7,04
$[\text{LH}_4]^{4+}$	29,22(1)	6,66
$[\text{LH}_5]^{5+}$	34,99(1)	5,77
$[\text{LH}_6]^{6+}$	40,44(1)	5,45
$[\text{LH}_7]^{7+}$	45,36(1)	4,92
$[\text{LH}_8]^{8+}$	49,97(1)	4,61



**6.4.1. táblázat és ábra:** A protonkomplexek bruttó stabilitási állandóinak logaritmusa ( $\log\beta_{\text{pqr}}$ ) és  $pK_{\text{pqr}}$  értékei ( $p = 0$ ) vízben. A zárójelben az utolsó értékes jegy hibája látható. ( $T=298\text{K}$ ,  $I=0,1 \text{ M NaClO}_4$ ) A jobb oldalon a ligandum eltérő mértékben protonált formáinak eloszlási diagramja látható a pH függvényében

A pH 4-9 között igen átfedő görbék közül az  $[H_4L]^{4+}$  képződik valamivel nagyobb mennyiségben, a továbbiakban deprotonálódó aminos csoportok nagyobb bázicitásának köszönhetően. Az azonos minőségű donorcsoportok deprotonálódási folyamatainak ily mértékű átfedése arra utal, hogy ezek nem befolyásolják egymást szignifikánsan, vagyis a peptid ágai egymástól távol helyezkednek el. A szerkezetet az induktív, elektrosztatikus, illetve belső hidrogénkötéseken keresztüli kölcsönhatások helyett a vízzel való kölcsönhatás határozza meg elsődlegesen. Ezt támasztja alá a következő megfontolás is: ha egy ligandumnak a (de)protonálódási helyei egyenértékűek, és a lépcsőzetes folyamatok során is azok maradnak, akkor a lépcsőzetes állandók arányai csak a statisztika törvényei szerint alakulnak. Ez azt jelenti, hogy annak valószínűsége, hogy egy N maximális koordinációs számmal jellemezhető  $H_jL$  (vagy  $M_jL$ ) összetételű komplexből kilépjen egy proton (vagy egyfogú ligandum), arányos az elfoglalt koordinációs helyek számával (j), míg egy proton bekötésének valószínűsége a még szabad koordinációs helyek számával (N-j) arányos. Ilyen feltételek mellett az alábbi egyenlőség áll fenn [169]:

$$K_1 : K_2 = \frac{N}{1} : \frac{N-1}{2}; \quad \text{ill.} \quad K_j : K_{j+1} = \frac{(N-j+1) \cdot (j+1)}{j \cdot (N-j)}$$

Az  $N = 4$  koordinációs számra számolt statisztikus arányokat és a ligandum 4-4 azonos protonálódási helyére számolt értékeket a 6.4.2. táblázat mutatja be.

	$K_j/K_{j+1}$	$K_{j+1}/K_{j+2}$	$K_{j+2}/K_{j+3}$	$K_j/K_{j+3}$
j = 1 (imidazol-N)	3,31	2,88	2,39	22,9
j = 5 (amino-N)	2,08	3,38	2,04	14,5
j = 1 statisztikus	2,67	2,25	2,67	16,0

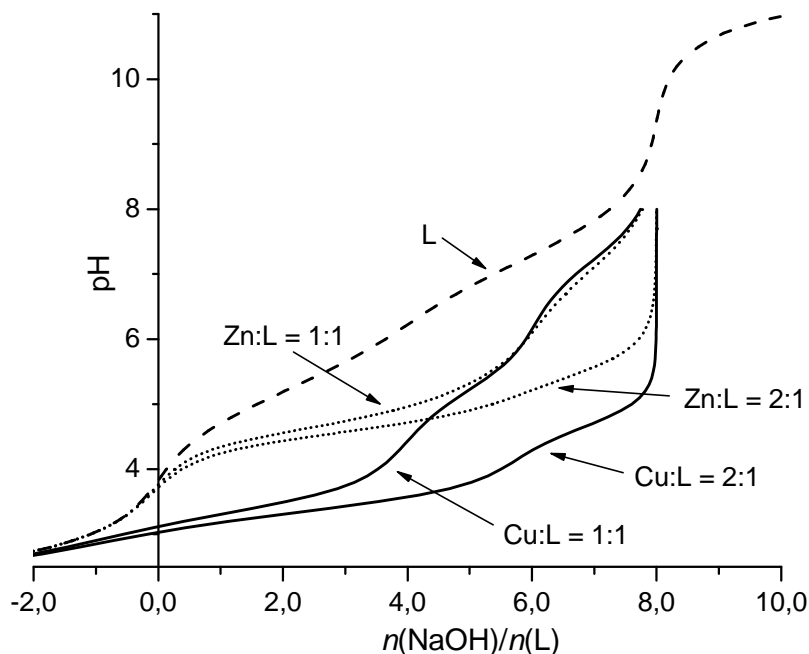
**6.4.2. táblázat:** A lépcsőzetes protonálódási állandók ( $K_j$ ) hányadosai, feltételezve hogy a titrálási görbén az első lépcső (j = 1-4) a négy imidazolnitrogénhez, a második lépcső (j = 5-8) a négy aminonitrogénhez rendelhető

Megállapítható, hogy a ligandum protonálódási állandóinak hányadosa nemcsak egy nagyságrendbe esik a statisztikus úton számolható hányadosokkal, de nagyon jó egyezést is mutat azokkal. A tapasztalat azt bizonyítja, hogy ha a kötőhelyek nem egyenértékűek, akkor az eltérés több nagyságrendben mérhető [170].

Bár a fentiekben szokatlan módon a pH-potenciometria alapján próbáltunk meg a ligandum oldatszerkezetére nézve következtetéseket levonni, állításainkat az NMR-spektroszkópiás vizsgálatok eredményei is alátámasztják. A ligandum savas oldatának egy- és kétdimenziós NMR-spektrumain az azonos minőségű, de különböző ágakon található funkcionális csoportok jelei egybeolvadnak, valamint a ROESY-spektrumban sem találhatók olyan keresztcsúcsok, melyekből nagy biztonsággal feltételezhetnénk bármiféle kitüntetett stabilitással bíró, kedvezményezett térbeli elrendeződést.

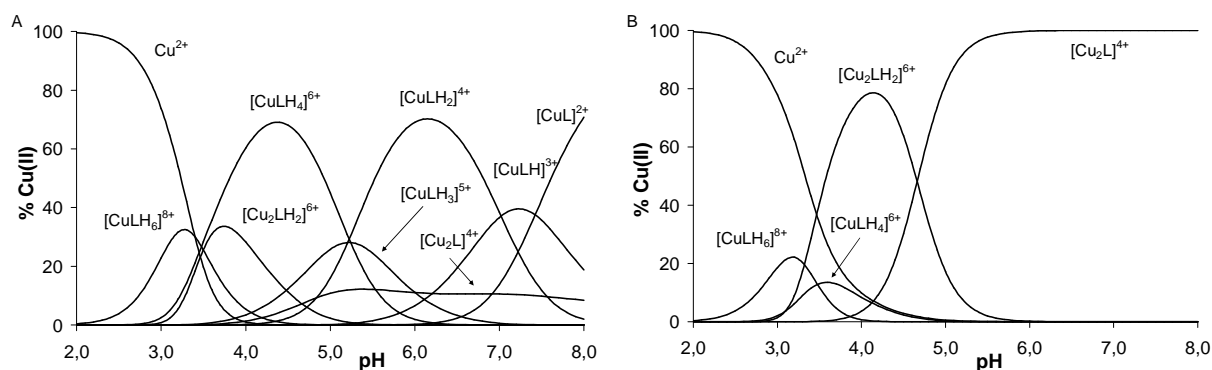
#### 6.4.2. A $(\text{His})_4\text{-(Lys)}_2\text{-Lys-CONH}_2$ peptid kölcsönhatása réz(II)ionokkal

Az 1:1 arányú Cu:L rendszer és a szabad ligandum titrálási görbéje hasonló lefutású (6.4.2. ábra). Az erős sav semlegesítése után pH ~ 5 és pH ~ 7 körül szintén két, meglehetősen átfedő lépcső figyelhető meg, melyekhez azonban a ligandumra nézve csak 2-2 ekvivalens lúgfogyás rendelhető. Következésképpen a fémionnal való kölcsönhatás során a feleslegben maradt erős sav megtitrálásával párhuzamosan, már pH 2–4 között megtörténik négy proton leadása. A fentiek alapján feltételezzük, hogy a fémion hatására két imidazol-N és két aminocsoport deprotonálódik savas közegben, hiszen a pH ~ 5 és pH ~ 7 értékeknél megfigyelhető két lépcső a még protonálva maradt különböző minőségű donorcsoportok (hisztidin imidazol-N, ill. aminocsoportok) deprotonálódására utal.



**6.4.2. ábra:** A szabad ligandum, valamint az 1:1 és 2:1 = fémion:ligandum arányú rendszerek titrálási görbéi  
( $[\text{L}] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $T = 298 \text{ K}$ ,  $I = 0,1 \text{ M NaClO}_4$ )

A  $[\text{CuH}_4\text{L}]^{6+}$  részecskére tehát a  $\{2\text{NH}_2, 2\text{N}_{\text{im}}\}$  bisz-hisztamin típusú koordinációs mód jellemző. Az ekvimoláris rendszerben a  $[\text{CuH}_4\text{L}]^{6+}$  komplextől a  $[\text{CuL}]^{2+}$  komplexig a pH-tól függően a maradék négy szabad láncvégi funkció különböző protonáltsági állapotban lehet (6.4.3.A ábra).

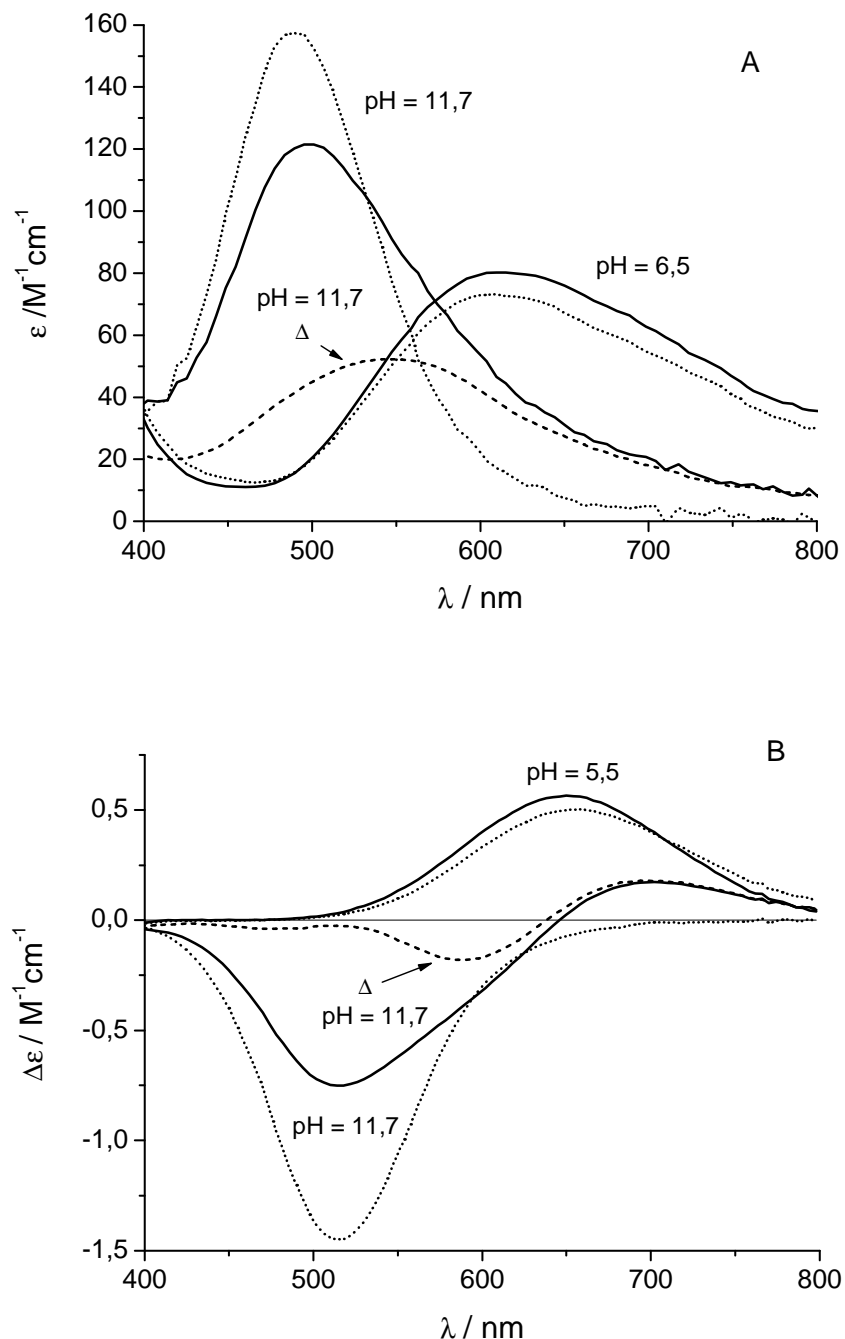


**6.4.3. ábra:** Az 1:1 (A) és a 2:1 (B) Cu:L arányú rendszerek részecskeeloszlási diagramja  
 ( $[\text{L}]_{\text{tot}} 1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $T=298 \text{ K}$ ,  $I=0,1 \text{ M NaClO}_4$ )

A potenciometriás titrálások értékelése során tett megállapítások alátámasztása, illetve a képződő fémkomplexek szerkezetének pontosabb meghatározása érdekében spektrofotometriás és CD spektroszkópiás méréseket végeztünk. Az 1:1 = Cu:L rendszerben savas közegből kiindulva a pH növelésével a fény látható hullámhossz tartományában rögzített elnyelési spektrum alapján pH ~ 5-re kialakul a legnagyobb elnyelésű komplex ( $\lambda_{\text{max}} \sim 620 \text{ nm}$ ), és innen kezdve az abszorbancia értékek és a görbe alakja változatlan pH ~ 8,5-ig. Az irodalmban a hasonló komplexekre fellelhető  $\lambda_{\text{max}}$  adatok [149,151,171] a potenciometria alapján javasolt bisz-hisztamin típusú koordinációt támasztják alá a  $[\text{CuH}_x\text{L}]^{(2+x)+}$  komplexekben ( $x = 0-4$ ). Ezek a komplexek csupán nem-koordinálódó oldalláncaik protonáltsági állapotában különböznek, de a fémion körüli lokális szerkezetük ugyanaz.

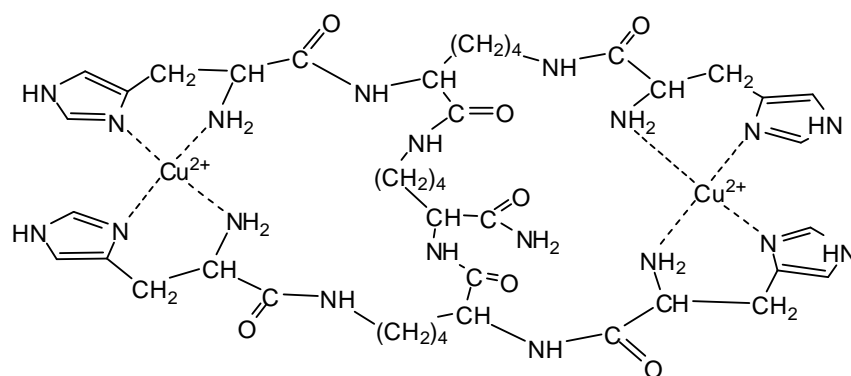
A CD-spektrumok további bizonyítékot nyújtottak eddigi megállapításainkhoz. Ismert, hogy a deprotonálódott amidnitrogének koordinációja a réz(II)ionhoz negatív Cotton-effektust idéz elő a  $d-d$  átmenetek hullámhossz-tartományában, míg az oldalláncok koordinációja pozitív effektust okoz [149]. Az 1:1 = Cu:L arányú rendszerben pH 3,4–8 tartományban mért CD-spektrumokban 650–660 nm közötti maximummal pozitív Cotton-effektust tapasztalunk, ami szintén azt erősíti, hogy a ligandum oldalláncán található donorcsoport kapcsolódik a fémionhoz. A  $[\text{CuH}_x\text{L}]^{(2+x)+}$  komplexek ( $x = 0-4$ ) moláris spektrumai azonosak (6.4.4. ábra, pontozott vonal pH=6,5 (A) és pH=5,5 (B)). Enyhén lúgos tartományban (pH 8 felett) kék színű csapadék képződött, ami pH ~ 10 fölött feloldódott, miközben az oldat színe is megvál-

tozott. A képződő csapadékot leszűrve és  $\text{HClO}_4$  segítségével újból feloldva kimutattuk, hogy ligandumot is tartalmaz, vagyis nem hidrolízis történt, hanem valószínűleg az oldatban képződő hidrofób komplex vált ki.



**6.4.4. ábra:** Az 1:1 (pontozott vonal) és 2:1 (folytonos vonal) réz(II):ligandum arányú rendszerekben képződő fő részecskék moláris elektrongerjesztési spektrumai a  $d-d$  átmenetek tartományában (A) és moláris CD-spektrumai (B). A spektrumok reprodukálhatósága  $\pm 0,03 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , ill.  $\pm 1,0 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . A  $[\text{CuH}_3\text{L}]^-$  és  $[\text{Cu}_2\text{H}_5\text{L}]^-$  komplexekre jellemző, rézre normált spektrumok különbségét ( $\Delta$ ) szaggatott vonallal jelöltük.

A 2:1 = Cu:L molarányú rendszer titrálási görbéjén pH ~ 3 körül egy hosszan elnyúló, jól puffereelt tartomány figyelhető meg, s pH ~ 5-ig mind a nyolc hidrogénion eltávozik a donor-csoportokról. Amint az eloszlási diagramon is látható (6.4.3.B ábra), pH ~ 5 fölött a  $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$  részecske az uralkodó, melynek a teljes rézkoncentrációra normált moláris spektruma (6.4.4. ábra, folyamatos vonal pH=6,5 (A) és pH=5,5 (B)) jó közelítéssel ugyanolyan alakú és intenzitású, mint az 1:1 = Cu:L arányú rendszerben képződő  $[\text{CuH}_x\text{L}]^{(2+x)+}$  komplexekre ( $x = 0-4$ ) jellemző görbék. Ez arra utal, hogy a két fémion egyformán bisz-hisztamin típusú módon kötődik a peptidhez, amint azt a 6.4.5. ábra szemlélteti.



6.4.5. ábra: A  $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$  komplex javasolt szerkezete

Amíg a ligandum négy ága a fémion távollétében egymástól távol helyezkedett el, addig a fémion hatására ezek meglehetősen könnyen kerültek olyan elrendeződésbe, mely stabilis kötés kialakítására alkalmas. Mivel a ligandum ágai eltérő hosszúak, három különböző lehetőség van arra, hogy megvalósuljon az említett koordináció. Vizes oldatban minden bizonnyal izomerek vannak jelen. Annak eldöntésére, hogy van-e kiemelt stabilitást nyújtó két ág, molekuláris dinamikai számításokat is végeztünk. Az eddigi számolások szerint a különböző izomerek energiája nagyon hasonló. A legstabilabban az első fémiont valószínűleg a két hasonló hosszúságú ág köti meg, míg a második fémionnak a legrövidebb és a leghosszabb ágak által kialakított kötőhely marad. Ez az információ azonban még bizonytalan, és disszertációmban nem tudunk olyan kísérleti eredményt bemutatni, mellyel igazolni tudnánk.

Az ekvimoláris rendszerhez hasonlóan csapadék képződését észleltük pH ~ 8 környékén, ami pH ~ 11-ig amidkoordinált részecskék képződése során feloldódott. A pH = 2-8 tartomány értékelése során számolt stabilitási állandókat a 6.4.3. táblázat tartalmazza.

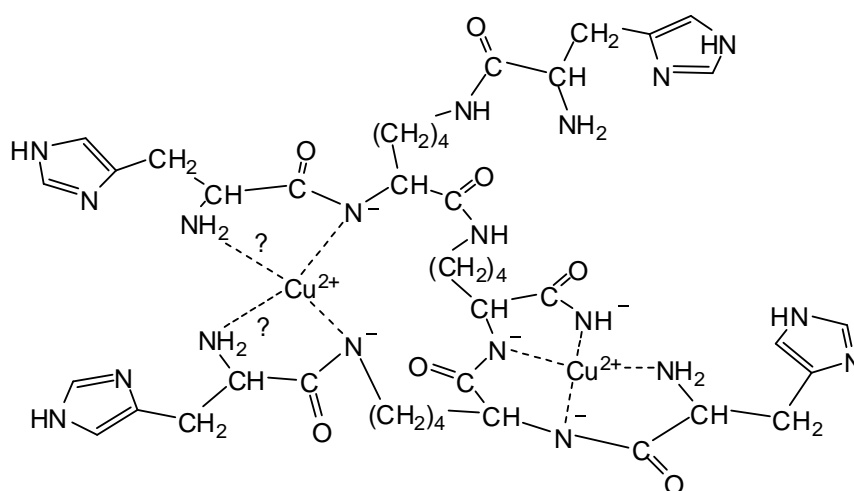
$M_p H_q L_r$	$Cu^{2+}$		$Zn^{2+}$	
	$\log \beta_{pqr}$	$pK_{pqr}$	$\log \beta_{pqr}$	$pK_{pqr}$
$[MH_6L]^{8+}$	46,60(2)		43,99(5)	
$[MH_4L]^{6+}$	39,65(2)	5,24	34,85(3)	4,94
$[MH_3L]^{5+}$	34,41(2)	5,21	29,91(3)	5,35
$[MH_2L]^{4+}$	29,20(1)	7,02	24,56(2)	6,75
$[MHL]^{3+}$	22,18(2)	7,43	17,81(2)	7,41
$[ML]^{2+}$	14,61(1)		10,40(2)	
$[M_2H_2L]^{6+}$	36,00(1)		28,60(3)	
$[M_2L]^{4+}$	26,68(1)		17,83(2)	

**6.4.3. táblázat:** A réz(II)- és cink(II)komplexek bruttó stabilitási állandóinak logaritmusa ( $\log \beta_{pqr}$ ) és  $pK_{pqr}$  értékei vízben ( $T = 298\text{ K}$ ,  $I = 0,1\text{ M NaClO}_4$ )

Lúgos közegben ( $pH > 10$ ) a csapadék feloldódásával egyidejűleg a látható fény elnyelési maximuma  $\sim 500\text{ nm}$ -re tolódik, míg negatív Cotton-effektus jelenik meg  $\sim 520\text{ nm}$ -nél. A spektroszkópiai tulajdonságok drámai megváltozása amidnitrogének deprotonálódását és réz(II)ionhoz történő koordinálódását jelzi a  $[CuH_3L]^-$  komplexben. Hasonló CD-spektrumokat mértek nem-koordinálódó oldallánccal rendelkező peptidek réz(II)komplexei esetében [172,173]. A fentiek tükrében a ligandum legrövidebb ága, az  $\alpha$ -aminosav váz közreműködésével kialakuló csatolt öttagú kelátgyűrűk kialakulása tűnik a legvalószínűbbnek.

Fémion felesleg jelenlétében ( $2:1 = Cu:L$ ) a  $[CuH_3L]^-$  komplexhez hasonló kötésmód azonban csak az egyik réz(II)ion számára lehetséges, a másikat ettől eltérő környezet veszi körül. A pH-metióval azonosított kétmagvú  $[Cu_2H_3L]^+$  ( $\log \beta \sim -1$ ) és  $[Cu_2H_5L]^-$  ( $\log \beta \sim -24$ ) részecskék összetétele is ezt támasztja alá, ugyanis a második fémionra csupán két ekvivalens proton fogy. A  $2:1 = Cu:L$  arányú rendszerben képződő  $[Cu_2H_5L]^-$  komplex moláris látható elnyelési és CD-spektrumai kisebb intenzitásúak, mint a  $[CuH_3L]^-$  komplexre jellemző görbék (6.4.4. ábra,  $pH=11,7$ ). A sávok szélesebbek és enyhén eltolódnak kisebb hullámhosszak felé. Ezen kívül a CD-spektrumon a negatív effektus mellett pozitív hozzájárulást is tapasztaltunk. Ennek oka, hogy a két réz(II)ion környezetének eltérése miatt aszimmetrikussá válik a komplex szerkezete. Ez a megfigyelés jól magyarázza az elnyelési spektrumvonal szélességét is. Ha a fémfelesleget tartalmazó rendszer moláris CD-spektrumából kivonjuk az ekvimoláris oldatban mért spektrum felét (6.4.4.B ábra,  $\Delta$ ), egy couplet-szerű, a fémion ekva-

toriális síkjában amid- és aminonitrogéneket *cisz-cisz* elrendeződésben tartalmazó komplexekre jellemző spektrumot kapunk [151]. Következésképpen, a  $[\text{Cu}_2\text{H}_5\text{L}]^-$  komplexben az egyik réz(II)ionra a  $[\text{CuH}_3\text{L}]^-$  komplexszel azonos  $\{\text{NH}_2, 3\text{N}^-\}$  kötésmód, míg a második réz(II)ionra a  $\{2\text{N}_{\text{im}}, 2\text{N}^-\}$  vagy  $\{2\text{NH}_2, 2\text{N}^-\}$  *cisz-cisz* kötésmód a jellemző. Utóbbi sokkal valószínűbb az öttagú kelátgyűrű kialakulása miatt (6.4.6. ábra).



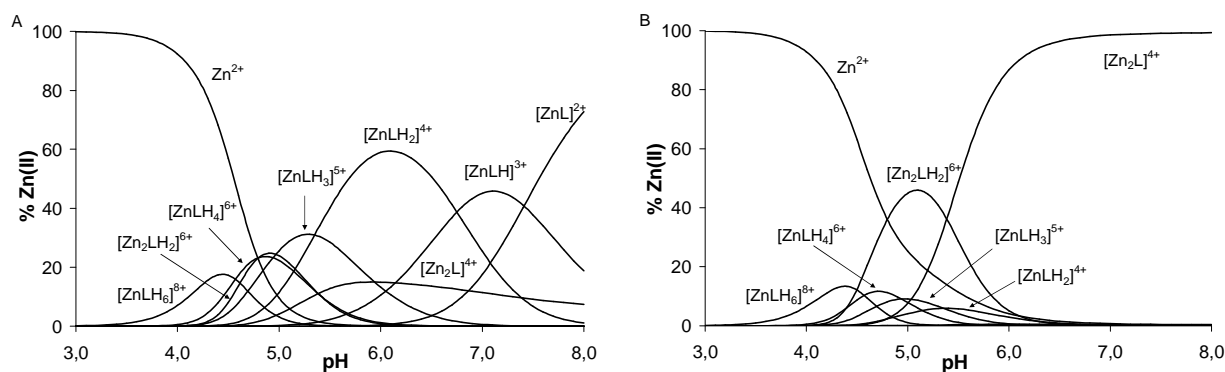
**6.4.6.ábra:** A  $[\text{Cu}_2\text{LH}_5]^-$  komplex javasolt szerkezete

#### 6.4.3. A $(\text{His})_4-(\text{Lys})_2-\text{Lys}-\text{CONH}_2$ peptid kölcsönhatása cink(II)ionokkal

A cink(II)tartalmú rendszerek hasonlóan viselkednek a réz(II)tartalmú rendszerekhez pH 3-8 között (6.4.7. ábra), habár az 1:1 = Zn:L rendszer titrálási görbéje (6.4.2. ábra) eltér az analóg réztartalmú rendszerétől. A pH 4-6 ill. 6-8 tartományban itt is két lépcsőt látunk, azonban az elsőben a ligandumra nézve hat ekvivalens proton távozik el, míg a második lépcsőben két ekvivalens. Valójában azonban itt is ugyanazok a folyamatok játszódnak le, mint a réz(II)nél. A cink(II)ion két amino és két imidazol csoport deprotonálódását segíti elő a koordináció révén, de a donorcsoportok savassága – a cink(II) gyengébb Lewis-sav volta miatt – nem nő meg oly mértékben, mint réz(II)ion jelenlétében. Emiatt nem válik el ennek a négy donorcsoportnak a deprotonálódási lépcsője a még szabad két imidazolcsoport deprotonálódási lépcsőitől. További lúgadalás hatására pedig a szabad két aminocsoport deprotonálódik pH ~ 8-ig. Ezután az oldatban csapadék jelenik meg, mely a lúgos tartományban sem oldódik föl. Egy újabb ekvivalens cink(II)ion hozzáadása után (2:1 = Zn:L arány) a titrálási görbén pH ~ 8-ig egyetlen, szűk lépcső figyelhető meg: itt távozik el mind a nyolc proton a ligandumról (6.4.2. ábra). Ezek alapján a réz(II)komplexek képződéséhez hasonlóan a ligandum két-két ága egymást jelentősen nem befolyásolva egy-egy  $\text{Zn}^{2+}$  iont koordinál pH



~ 8-ig a  $[\text{Zn}_2\text{L}]^{4+}$  részecskében. A cinktartalmú rendszer titrálási görbéje magasabban fut, mint a 2:1 = Cu:L arányú rendszer esetén mért, vagyis a cink(II)komplexek kevésbé stabilak, mint a réz(II)komplexek (6.4.3. táblázat). Érdekes, hogy a titrálási görbe utolsó két ekvivalensnyi szakasza laposabb, összevetve a réz(II)nél megfigyelttel. A jelenség összhangban van azzal, hogy a két szabad imidazol deprotonálódása párhuzamosan fut az első fémion koordinációjával. Horgonyként elősegítik a második cink(II)ion megkötését, ami így hatékonyan képes versengeni az aminocsoportok protonjaival szemben. Az eloszlási diagram (6.4.7.B ábra) arról tanúskodik, hogy a  $[\text{Zn}_2\text{L}]^{4+}$  részecske uralkodik pH ~ 6 fölött az oldatban, pH ~ 8 fölött pedig csapadék képződik a 2:1 = Zn:L arányú rendszerben is, ami még lúgos körülmények között sem oldódik fel.

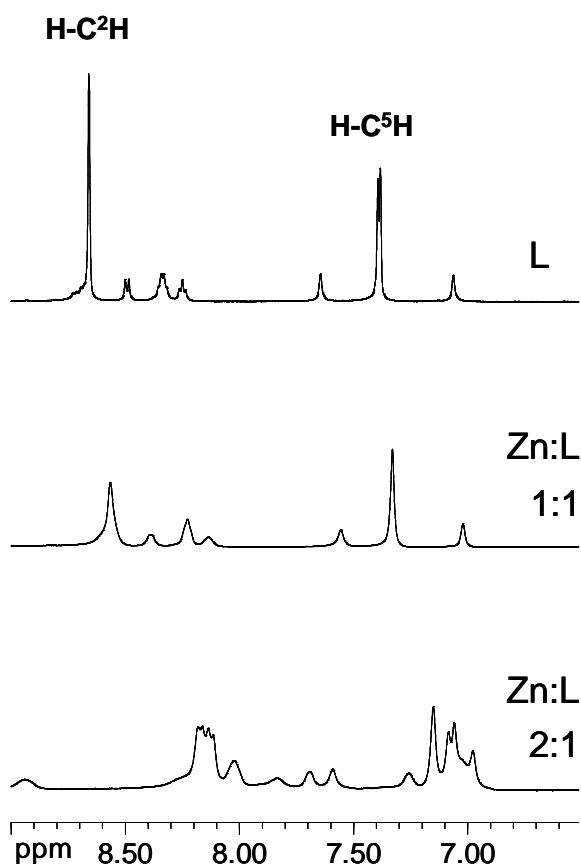


**6.4.7. ábra:** Az 1:1 (A) és a 2:1 (B) Zn:L arányú rendszerek részecskeeloszlási diagramja

( $[\text{L}]_{\text{tot}} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $T = 298 \text{ K}$ ,  $I = 0,1 \text{ M NaClO}_4$ )

A cink(II)ion koordináció mélyebb megismerése érdekében  $^1\text{H}$ -NMR-méréseket is végeztünk. A ligandum  $\text{C}^2\text{H}$  és  $\text{C}^5\text{H}$  imidazol protonjainak  $^1\text{H}$ -NMR-jelei cink(II)ionok távol és jelenlétében (1:1 és 2:1=Zn:L aránynál) a 6.4.8. ábrán láthatók. Egy ekvivalensnyi cink(II) hozzáadásakor a jelek eltolódnak és kiszélesednek ugyan a koordináció következtében, de még jól látható a  $\text{C}^2\text{H}$  és  $\text{C}^5\text{H}$  jelcsoport, ami alapján nem valószínű, hogy lenne kitüntetett bisz-hisztamin típusú kötőhely a molekulán belül. A fémion hatása ugyanolyan mértékben érinti mind a négy hisztidin funkciót, az izomerek gyors ligandumcserében állnak egymással. Jelentősen megváltozik a spektrum, ha további ekvivalens cinket adunk a rendszerhez. A hisztidin  $\text{C}^2\text{H}$  és  $\text{C}^5\text{H}$  imidazol jelei tovább tolódnak és szélesednek. Ez arra utal, hogy a  $[\text{Zn}_2\text{L}]^{2+}$  komplexben egy kedvező fémkötő hely elrendeződés kerül előtérbe a fémionok számára. Továbbá megfigyelhető a jelek felhasadása a ligandum cseresebesség csökkenésének következtében. Ez utóbbi jelenség oka pl. abban keresendő, hogy mindkét fémionnak egyidőben kell kiszabadulni a koordinációs szférából, hogy új kötőhelyhez jusson. Annak

valószínűsége, hogy ez megvalósuljon sokkal kisebb, mint a  $[\text{ZnL}]^{4+}$  részecskében. A korábban említett kitüntetett elrendeződés léte tehát igazoltnak látszik.



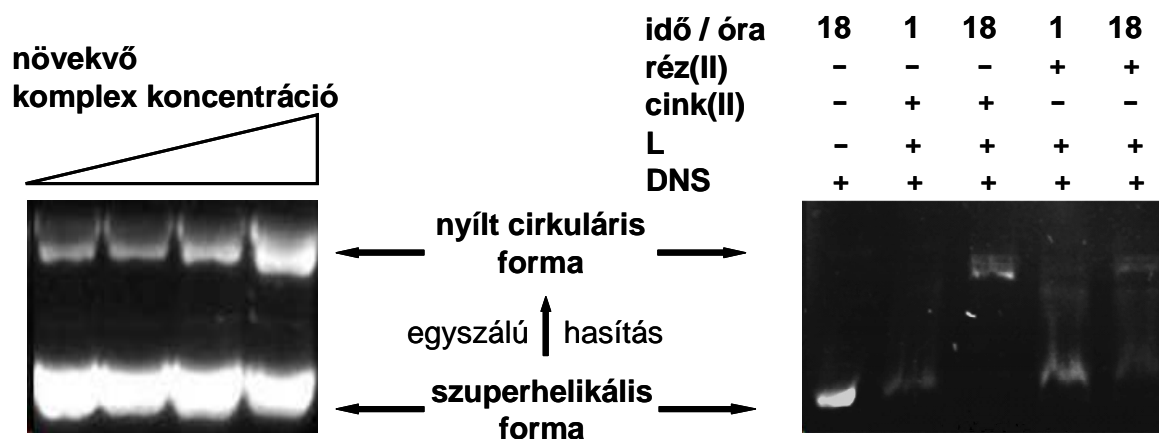
**6.4.8. ábra:** A ligandum  $\text{C}^2\text{H}$  és  $\text{C}^5\text{H}$  jelei fémion távol- és jelenlétében  $\text{pH}^* = 5,5$ -nél 10/90%  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ -ban ( $[\text{L}]_{\text{tot}} = 5,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $T = 298 \text{ K}$ )

#### 6.4.4. Enzimaktivitás vizsgálatok

##### 6.4.4.1 DNS hidrolízisének vizsgálata

Mivel célunk többek között nukleáz enzimet modellező vegyület előállítása volt, ezért tanulmányoztuk az elágazó láncú peptid fémkomplexeinek kölcsönhatását DNS-sel a kísérleti részben leírt körülmények mellett. Az esetek többségében nem tapasztaltunk szignifikáns hasítást, a  $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$  komplex azonban ígéretes hatást fejtett ki (6.4.9. ábra, bal oldal). A komplex mennyiségének növelésével egyre nagyobb mértékben alakult át a DNS szuperhelikális formája nyílt cirkuláris formává. A gélelektroforézis alapján a  $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$  részecske viszonylag hatékonyan hasította a DNS-t, habár nem állíthatunk biztosit arról, hogy oxidatív módon vagy hidrolitikus úton fejtette-e ki hatását. Hasonló kísérleteket végeztünk a gyantára kötött

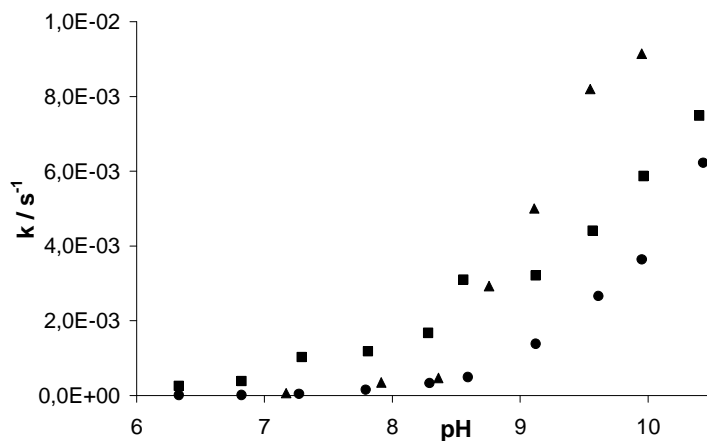
ligandum fémkomplexeivel is. A 6.4.9. ábra jobb oldalán látható agaróz gélelektroforézis eredmény azt mutatja, hogy a cink(II)tartalmú rendszer különösen aktívnek bizonyult: 18 óra alatt a DNS szuperhelikális formája teljes mértékben nyílt cirkuláris formává alakult.



**6.4.9. ábra:** Az agaróz gélelektroforézis eredménye. *Bal oldal:* pUC18 plazmid DNS-t egy éjszakán át inkubáltunk 310 K-en, pH = 7,1-nél a  $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$  komplexszel különböző koncentrációban ( $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = 2,0 \times 10^{-4}$ – $2,0 \times 10^{-3}$  M). *Jobb oldal:* pUC18 plazmid DNS-t 1 és 18 órán át inkubáltunk 310 K-en, pH = 7,1-nél a gyantára kötött peptid kis részleteivel kétszeres fémion felesleg esetében. A + és – jelek azt jelzik, hogy a minta koktélaban az adott alkotó jelen van-e vagy sem.

#### 6.4.4.2 A 3,5-ditercbutil-pirokatechin ( $\text{H}_2\text{dtbc}$ ) oxidációja

A réz(II) –  $(\text{His})_4(\text{Lys})_2\text{-Lys-CONH}_2$  rendszer oldategyensúlyi, szerkezeti viszonyainak és hidrolitikus aktivitásának vizsgálata mellett, a réz(II)komplexek oxidáz funkcióját is vizsgáltuk. A méréseket a kísérleti részben leírt körülmények között végeztük el, 44 (m/m)%-os, oxigénnel telített etanol-víz elegyben. Ebben az oldatban az alkalmazott  $5,0 \times 10^{-4}$ , ill.  $2,0 \times 10^{-4}$  M komplex koncentráció mellett nem figyeltük meg a titrálások során bekövetkező csapadék-képződést. Az ekvimoláris rendszer pH ~ 8,5-ig nem mutatott jelentős oxidatív aktivitást. A pH növelésével a  $\text{H}_2\text{dtbc}$  oxidációja kissé gyorsabb lett, mint az autooxidáció, de messze elmaradt a hatékony modell komplexek esetén mérhető, több nagyságrendbeli különbségtől. A kétmagvú komplex esetében az oxidációs folyamat pH ~ 8-ig ugyan gyorsabb volt, mint az 1:1 arányú rendszerben, de lúgos tartományban lassabbá vált (6.4.10. ábra). Habár az etanolos oldatban nem ellenőriztük a részecskeeloszlást, feltételezzük, hogy a katalitikus hatás a  $[\text{CuL}]^{2+}$  és  $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$  részecskékhez vagy vegyes hidroxokomplexekhez rendelhető. Részletes vizsgálatot a csekély affinitás miatt nem végeztünk.



**6.4.10. ábra:** A réz(II)–(His)<sub>4</sub>–(Lys)<sub>2</sub>–Lys–CONH<sub>2</sub> rendszerben a H<sub>2</sub>dtbc oxidációjára számolt korrigált kezdeti sebesség értékek pH függése 44 (m/m)% etanol-víz oldatban (T = 298 K, [H<sub>2</sub>dtbc] = 2×10<sup>−4</sup> M, autooxidáció (●), az egymagvú [CuL]<sup>2+</sup> hatása (▲, [Cu<sup>2+</sup>]<sub>tot</sub> = 5×10<sup>−4</sup> M) és a kétmagvú [Cu<sub>2</sub>L]<sup>4+</sup> komplex hatása (■, [Cu<sup>2+</sup>]<sub>tot</sub> = 4×10<sup>−4</sup> M)

## 7. Összefoglalás

A biokémiai kutatások eredményeként az elmúlt években nagyszámú fehérje/enzim esetén azonosítottak olyan viszonylag rövid, rögzített szerkezettel nem rendelkező, hisztidinben gazdag alegységeket, melyek a biomolekula egyéb részeitől jórészt függetlenül működve nagy jelentőséggel bírnak az adott funkció ellátása szempontjából. E szekvenciák a legtöbb esetben erős fémkötő helyek, melyekről igazolták, hogy a fémion koordinációja meghatározza/kiegészíti a fémtartalmú fehérje/enzim funkcióját. A biológiai szerepük, így a fémionokkal való kölcsönhatásuk megismerése alapvető a hatásmechanizmus feltárása szempontjából. Mivel a kiválasztott, természet ihlette peptidfragmensek esetében a fémion(ok) megkötésében a fehérje egyéb részei nem játszanak szerepet, remény nyílt arra, hogy kiküszöböljük a makromolekula térbeli szerkezetéből származó hatások érvényesülését a kismolekulák vizsgálatakor. A négy fő fejezetből felépülő disszertációmban a fenti stratégiát követve nagyrészt viszonylag rövid, hisztidinben gazdag szekvenciák – többek között a terápiás felhasználás lehetőségét is magukban hordozó peptidfragmensek – fémkötő sajátságainak vizsgálata szerepel.

Az első fejezetben a *hisztidingazdag glikoprotein* (HRG) fémkötő helyeinek szerkezeti modellezését tűztük ki célul. A HRG egy az emberben is jelentős koncentrációban előforduló plazma fehérje, melynek hisztidinben gazdag régiója (HRR) tandem módon ismétlődő (G)HHPH(G) szekvenciát tartalmaz. A kutatási eredmények arra utalnak, hogy HRR számos biológiai folyamat szabályzásában vesz részt, melyekben alapvető szerepet kap ezen alegység különböző fémionokkal (pl. Zn(II), Cu(II)) kialakított erős kölcsönhatása.

Az **Ac-HHPHG-NH<sub>2</sub>** (**HP1**) és **Ac-HHPHGHHPHG-NH<sub>2</sub>** (**HP2**) penta- és deka-peptidek, valamint cink(II)- és réz(II)komplexeiknek oldategyensúlyi és oldatszerkezeti vizsgálataival tisztáztuk a kérdéses szekvenciák protonálódási viszonyait. Meghatároztuk az egyes fémionokkal alkotott komplexek összetételét és szerkezetét, melyből a makromolekula fémkötő sajátságaira is lehet következtetni. A **HP1** és **HP2** koordinációs viselkedése számottevő eltérést mutat mind cink(II)-, mind réz(II)ionok jelenlétében. A penta-peptiddel ellentétben a **HP2** semleges pH-n nagy affinitású kötőhelyet biztosít mindkét fémion számára, legalább négy imidazol donorcsoport kizárólagos koordinációja révén. Az első fémion koordinálódása során a deka-peptid konformációja megváltozik, s így a második fémion egy kedvezményezett kötőhelyet foglalhat el. Az  $[M_2L]^{4+}$  részecskék bruttó stabilitási állandója figyelemre méltó extra stabilizációról ( $\Delta$ ) tanúskodik a **HP2** kétmagvú komplexeiben, összevetve a **HP1**  $[ML]^{2+}$  komplexeivel:  $\Delta_{Zn} = \log\beta_{Zn_2(HP2)} - 2 \times \log\beta_{Zn(HP1)} = 1,91$  illetve  $\Delta_{Cu} = \log\beta_{Cu_2(HP2)} - 2 \times \log\beta_{Cu(HP1)} = 2,08$ ). A konformációs átalakulás lehet az oka a kooperatív

fémion megkötésnek rendszerünkben, és nem kizárt, hogy a natív HRG-ben is hasonló folyamatok játszódnak le.

Értekezésem második részében az *endostatin* fehérje N-terminális szakaszának fémkötő sajátságait határoztuk meg. A 20 kD tömegű, 183 aminosavból álló, cinktartalmú fehérje egy a szervezetben természetes módon képződő ígéretes rákellenes szer, mely mellékhatásoktól mentesen, az érújdonképződés gátlásán keresztül fejt ki hatását. Legújabban kimutatták, hogy a 25 tagú N-terminális fragmens és a teljes fehérje tumorelles aktivitása megegyezik. A cink(II)ion jelenléte mindkét esetben szükséges a rákellenes hatás kifejtéséhez.

Az általunk előállított tizenkét tagú, az *endostatin* fehérje N-terminális szekvenciájával megegyező **HSHRDFQPVLHL-NH<sub>2</sub>** peptid cink(II)komplexe fiziológiás pH-n {NH<sub>2</sub>,3N<sub>im</sub>,COO<sup>-</sup>} szerkezetű, ami feltehetőleg megegyezik a 25 tagú fragmens kötés módjával. A peptid réz(II)affinitása rendkívül nagy ( $K_D = 2,6 \times 10^{-15}$  M), megközelíti a réztartalmú fehérjékre jellemző értékeket. A semleges pH tartomány körül albuminszerű {NH<sub>2</sub>,N<sup>-</sup>,N<sup>-</sup>,N<sub>im</sub>} kötés mód valósul meg a [CuH<sub>2</sub>L]<sup>-</sup> komplexben. E tekintetben érdemes megemlíteni, hogy az érképződéshez lokálisan magas réz(II) koncentráció szükséges, s ez utóbbi csökkenése révén lehetséges a rákos sejtek növekedésének gátlása. Kísérleti eredményünk azt sugallja, hogy a réz(II) megkötése szerepet játszhat az *endostatin* biológiai feladatában.

A harmadik fejezetben a közelmúltban felfedezett, nikkel(II)tartalmú szuperoxid-dizmutáz család N-terminális fragmensének fémkötő sajátságait tártuk fel. Az enzimben a katalitikus hatásért felelős nikkel mind oxidált (Ni<sup>III</sup>), mind redukált (Ni<sup>II</sup>) formában kizárólag a His1, Cys2 és Cys6 aminosavakhoz kötődik.

Az enzim N-terminális szekvenciájával megegyező **HCDLPCG-NH<sub>2</sub>** heptapeptid egyedülálló lehetőséget kínált a nikkelkötő hely modellezésére. A natív enzimben már pH ~ 4 körül megfigyelhető síknégyzetes {NH<sub>2</sub>,N<sup>-</sup>,S<sup>-</sup>,S<sup>-</sup>} koordinált szerkezet csupán pH ~ 9 körül alakul ki a nikkel(II)ion és a ligandum ekvimoláris oldatában. További eltérés az enzimhez képest, hogy 2D NMR-spektrumaink alapján a Leu4-Pro5 kötés *cisz* konformáció helyett *transz* konformációt vesz fel a nikkel(II)–**HCDLPCG-NH<sub>2</sub>** komplexben. Habár a Ni-SOD N-terminálisa nem rendelkezik szigorúan rögzített szerkezettel, a hidrogénhidas kölcsönhatások, illetve a *cisz* Leu4-Pro5 kötés olyan kedvezményezett konformációt biztosítanak a fémion számára, hogy kb. 5 egységgel kisebb pH-n megvalósul az említett szerkezet. A peptid pH = 9-nél számolt nikkel(II)affinitása ( $K_D = 2,0 \times 10^{-15}$  M) viszont már ugyanolyan mértékű, mint az enzim fémkötő erőssége. Az NMR-spektrumok bonyolultsága és a szemiempirikus számolásaink eredményei arra engednek következtetni, hogy a prolin izomérián kívül a makrokelát hurok sík alatti, ill. feletti elhelyezkedése tovább növeli a lehetséges izomerek számát. A

komplex a legtöbb Ni-komplexnél jóval hatékonyabban dizmutálta a szuperoxid gyököt ( $IC_{50} = 1,9 \times 10^{-6} \text{ M}$ ), habár aktivitása két nagyságrenddel kisebb, mint a természetes enzimé. Ennek oka szintén az eltérő konformációban, továbbá a Tyr9 fenolos hidroxilcsoport irányító/stabilizáló hatásának hiányában keresendő.

A fémtartalmú fehérjék/metalloenzimek működésének mind teljesebb megismerése mellett a bioszervetlen kémia másik meghatározó kutatási iránya a gyakorlati felhasználást lehetővé tevő mesterséges fehérjék/enzimek kifejlesztése. A hidrolitikus feladatot ellátó metallonukleázok és az oxidációs folyamatokat katalizáló 2-es és 3-as típusú réztartalmú enzimek szerkezeti és működési modellezése mind nagyobb figyelmet kapott az utóbbi években. A nagyszámú hisztidin-peptid fémkomplex vizsgálata rámutatott arra, hogy a hatékony modellvegyületekben a ligandum megfelelő számú és a peptid szekvenciában megfelelő helyet elfoglaló hisztidin alegységet tartalmaz.

E stratégia folytatásaként értelmezhető dolgozatomban negyedik fő fejezete, melyben egy új típusú ligandum koordinációs kémiai viselkedését és enzimaktivitását vizsgáltuk cink(II)- és réz(II)ionok jelenlétében. A hét aminosavból – 3 lizinből és 4 hisztidinből – álló elágazó láncú **(His)<sub>4</sub>-(Lys)<sub>2</sub>-Lys-CONH<sub>2</sub>** peptid pH ~ 8-ig kizárólag az amino- és imidazolcsoportokon keresztüli *biszhisztaminszerű* fémion-koordinációt valósít meg cink(II)- és réz(II)ion jelenlétében. Az enyhén lúgos pH tartományban csapadékként kiváló töltésszemleges réz(II)komplex pH 10 felett feloldódott amidkoordinált, csatolt öttagú kelátgyűrűs  $[\text{CuH}_3\text{L}]^-$  részecske képződése során. Rézfelesleg alkalmazásakor a csapadékképződés után kialakuló  $[\text{Cu}_2\text{H}_5\text{L}]^-$  komplexben a második réz kötésmódja eltér az elsőétől. Feltehetőleg két amid- és két aminonitrogén veszi körül. Az egymagvú  $[\text{CuL}]^{2+}$  és a kétmagvú  $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$  komplex oxidatív aktivitása elmaradt a várakozásainktól, ill. az  $\text{H}_2\text{dtbc}$  autooxidációja és a hatékony modell komplexek esetén mérhető, több nagyságrendbeli különbségtől. A hidrolitikus vizsgálatok során a kétmagvú  $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$  komplex viszonylag hatékonyan hasította a DNS-t pH = 7,1-nél, habár nem állíthatunk biztosan arról, hogy oxidatív módon vagy hidrolitikus úton fejtette-e ki hatását. A hasítási kísérletet megismételtük a gyantára kötött ligandum fémkomplexeivel is pH = 7,1-nél. A cink(II)tartalmú rendszer különösen aktívnak bizonyult, 18 óra alatt a DNS szuperhelikális formája teljes mértékben nyílt cirkuláris formává alakult.

## 8. Summary

### Interaction of bioinspired multihistidine ligands with zinc(II), copper(II) and nickel(II) ions

This thesis lies inside the domain of bioinorganic chemistry, a borderland that embraces the chemistry of metal-containing molecules within biological systems, since many metal ions are of vital importance for living creatures. This field is concerned with the control and use of metal ions in biochemical processes. To our knowledge up to now, approx. 30% of the enzymes catalysing biochemical processes contain metal ion(s). The effect of transition metals is exerted almost exclusively by binding to biomolecules, mostly to proteins. Learning about their role in proteins/enzymes is essential to understand the mechanisms of their actions. Modern bioinorganic chemistry has two important research directions; one is focusing on the more and more detailed exploration of the function and mechanisms of metalloproteins/enzymes, and the other is the development of artificial proteins/enzymes possessing the potential for future practical applications.

These kinds investigations can be classified into two parts supplementing each other, the study of (i) native proteins/enzymes and (ii) their small model complexes. Both approaches have advantages and disadvantages. The investigations of macromolecules are difficult. Many times the provided information are difficult to interpret because of the complexity of the system. Nevertheless, these studies are irreplaceable. On the other hand, even the best model complexes are only able to give a distorted picture of the metal binding site. However, they are much simpler than proteins, thus, they can be handled and examined easier. They present opportunity to gain knowledge on the role and features of some parts of the full processes and structural motifs. Often this is impossible for the native systems. Last but not least efficient model systems may help in developing proteins with therapeutic use, practical application and develop biomimetic catalysts/artificial enzymes.

Based on our present knowledge among the amino acids the side chain donors of histidine and cysteine form the strongest interaction with most transition metal ions. It is in line with the fact that the metal binding sites of the proteins are usually built from these amino acids. Since the imidazole ring plays fundamental role in the metal binding sites of proteins, the metal complexes of many histidine-containing peptides have been studied in the previous decades. However, only few of these compounds could be considered as adequate models for the metal ion–protein interaction, since investigations of multihistidine peptides having 3-4



histidine units are very scarce. Precipitation occurred almost in all previously studied zinc(II)-containing model systems and amide-coordinated species are predominant in the physiological pH range for almost all previously studied peptides in the presence of copper(II) ion. That eliminates the structural and functional analogy between the proteins to be modelled and the peptides investigated. Probably, this is also a reason for the mentioned fact that metallopeptides have not yet been investigated as functional models for hydrolytic and oxidative enzymes. Another difficulty of model studies to be overcome is that the environment of the active centers has fixed structure in most cases. Furthermore, the metal binding sites are often far away from each other in the amino acid sequence. These facts render the metalloenzyme mimicking by (small) peptides very difficult.

However, recent biochemical studies pointed out the presence of relatively short, histidine-rich subunits with no fixed structure in a large number of proteins and enzymes that operate more or less independently from other parts of the biomolecule, while having a great importance in view of the given function. These sequences have strong metal binding ability in most cases and the metal ion coordination – according to various biological studies – determines or contributes to the function of the protein/enzyme.

The main goal of our research was the investigation of the metal binding properties of such bioinspired, relatively short histidine-rich sequences, including peptide fragments with potential therapeutic use, frequently appearing in proteins and enzymes.

The first main chapter is about the structural modelling of the metal binding site of the human histidine-rich glycoprotein (HRG) with the zinc(II) and copper(II) complexes of the tandem-repeat pentapeptide fragment **Ac-HHPHG-NH<sub>2</sub> (HP1)** and its 10-mer dimer **Ac-(HHPHG)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (HP2)**. They are the minimum metal binding motifs of the histidine-rich region (HRR) and have been synthesized with protections at both termini. HRG is an abundant plasma protein having a central HRR with tandem sequence repetition (in humans (G)HHPH(G) is repeated 12 times). The His-rich domain of HRG has a remarkable ability to bind divalent metal ions, e.g. Zn(II) and Cu(II). HRG was found to regulate numerous biological processes, e.g. angiogenesis, cell adhesion and migration, fibrinolysis and coagulation. The metal ion (mostly Zn(II)) binding of the HRR region has probably a crucial importance in these functions, i.e. the coordination of Zn(II) to the HRR promotes the binding of HRG to other proteins and receptors. In order to get a deeper insight into the mechanism of the HRG functions and to clarify the role of metal ions, it is essential to characterize the metal binding properties of the macromolecule. This may be achieved by model studies on the metal complexes of specific peptide fragments of the HRR.

The zinc(II) and copper(II) binding ability of **HP1** and **HP2**, and the structure of the formed complexes have been investigated by means of potentiometry, NMR-, UV-Vis-, CD-, SRCD- and EPR spectroscopies. Exclusive coordination of the side-chain imidazoles of the peptides has been observed with both metal ions in the acidic and neutral pH range. In alkaline solution precipitation occurred in the presence of zinc(II) and various amide-coordinated species were formed in the copper(II)-containing systems. On the basis of EPR measurements dimer complexes formed between pH 7-10 in the 1 to 1 ratio **HP1**–copper(II) and in the 1 to 2 ratio **HP2**–copper(II) systems. In contrast with the pentapeptide, **HP2** provides high-affinity binding site for both metal ions around neutral pH by the exclusive coordination of the side chains of at least four imidazole donors. The conformational change of **HP2** during the coordination of the first metal ion creates a favored binding site for the second metal ion, resulting in an important extra stabilization ( $\Delta$ ) for the  $[M_2L]^{4+}$  complexes, as compared to the  $[ML]^{2+}$  species of the shorter sequence:  $\Delta_{Zn} = \log\beta_{Zn_2(HP2)} - 2 \times \log\beta_{Zn(HP1)} = 1.91$  and  $\Delta_{Cu} = \log\beta_{Cu_2(HP2)} - 2 \times \log\beta_{Cu(HP1)} = 2.08$ . Such conformational changes may explain the cooperative metal binding in our system, but whether similar changes occur in the native HRG protein upon metal binding is a question still to be answered.

In the second part of the work we report on the solution chemical investigation of the zinc(II) and copper(II) complexes of **HSHRDFQPVLHL-NH<sub>2</sub>** peptide, which is identical with the N-terminal fragment of human endostatine. Endostatine, a zinc-containing protein (approx. 20 kDa), being present also in humans, is a widely studied molecule due to its well documented antitumor activity provided without any side effects. The antitumor activity of the protein is caused by its antiangiogenic and antimigrating effects. The antitumor activity and mechanism of the action of the 25-amino-acid N-terminal fragment and the full protein are equivalent, which is of crucial importance for the sake of future therapeutic use. The presence of the metal ion is necessary to exert the antitumor effect in both cases. The details of the zinc(II) ion interaction and the solution structure, especially for the N-terminal fragment possessing antitumor activity, is not known. Interestingly, endostatine also possesses an amino terminal Cu(II)- and Ni(II)-binding (ATCUN) motif, an efficient copper(II) binding site found in the N-terminus of many naturally occurring proteins.

In order to determine the metal-binding properties of the N-terminal fragment of endostatin, we performed equilibrium, UV-Vis, CD, EPR and NMR studies on the zinc(II) and copper(II) complexes of the dodecapeptide. In the presence of zinc(II) the formation of a stable  $\{NH_2, 3N_{im}, COO^-\}$  coordinated complex was detected in the neutral pH range. This coor-

dination mode is probably identical to that present in the zinc(II) complex of the above-mentioned N-terminal 25-mer peptide fragment of human endostatin. In addition, the peptide has extremely high copper(II)-binding affinity ( $K_D = 2.6 \times 10^{-15}$  M at pH = 7.4), close to those of copper-containing metalloenzymes, and forms albumin-like  $\{NH_2, N^-, N^-, N_{im}\}$  coordinated  $[CuH_2L]^-$  complex in the neutral pH range. Since copper acts as an essential co-factor in angiogenesis, this finding may suggest that copper(II) binding is involved in the biological activity of endostatin.

The **HCDLPCG-NH<sub>2</sub>** sequence is the N-terminal fragment of a recently discovered superoxide-dismutase (SOD) family. It contains only one histidine unit. The investigation of the metal-binding abilities of the sequence makes the third pillar of my thesis. Superoxide radical ( $O_2^{\cdot -}$ ) is a toxic byproduct of aerobic respiration. Besides many free radicals are scavenged by dioxygen to form superoxide. Therefore, the SOD enzymes, catalyzing the disproportionation of superoxide, are the major regulators of free radical and reactive oxygen species balance in organisms. The aforementioned SOD family, occurring in *Streptomyces* bacteria, contains nickel and shows no homology with the SODs of higher organisms. The nickel center, responsible for the catalytic activity of the enzyme, is exclusively bound to the His1, Cys2 and Cys6 amino acids both in its oxidized ( $Ni^{III}$ ) and reduced ( $Ni^{II}$ ) forms. The well-conserved N-terminal sequence  $^1HCDXPC-$  ( $X = G$  or  $L$ ) provides almost all interactions critical for metal binding and catalysis. The investigation of Ni(II) complexes of the N-terminal fragment forming the active center of these enzymes, and the comparison to the well-known Cu,Zn-SOD and Mn/Fe-SOD provide a possibility to explore the most efficient strategy of superoxide dismutation that may lead to the development of *e.g.* highly efficient antioxidant agents.

Here we report on the solution chemical (pH-metry, UV-Vis, CD, 1D and 2D NMR) investigations of the nickel(II) complexes of **HCDLPCG-NH<sub>2</sub>** heptapeptide which is identical with the N-terminal sequence of the lately discovered nickel containing superoxid-dismutases and provides unique possibility to mimic the nickel binding site. The square planar geometry which can be observed in the native enzyme already around pH ~ 4 is present above pH ~ 6 as a binding isomers. The  $\{NH_2, N^-, S^-, S^-\}$  coordinated structure, which is typical for the enzyme forms in 100% around pH ~ 9 in the equimolar solution of the ligand and nickel(II) ion. The metal binding strength of the peptide ( $K_D = 2.0 \times 10^{-15}$  M) is commensurable with that of the enzyme. The *cis* geometry of the Pro5 in the amide bond of the Ni-SOD enzymes evolves parallel with the binding of nickel and the formed H-bridges stabilize the structure. The NMR spectra of the peptide recorded in the presence of nickel suggest a *cis-trans* isomerism of proline amide bond, but in the lack of the stabilizing H-bridges the *cis* conformation

is not exclusive. The  $[\text{NiL}]^-$  and  $[\text{NiH}_2\text{L}]^{2-}$  species possess excellent SOD activity ( $\text{IC}_{50} = 1,9 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) among the  $\text{Ni}^{2+}$  complexes, but their activities are less with two order of magnitudes than that of the native enzyme. Probably the reason for this phenomenon is the different conformation and the lack of the directing/stabilizing effect of Tyr9 that regulates the coupling of the substrate.

Beside the more and more detailed exploration of the functioning and mechanisms of proteins/metalloenzymes, bioinorganic chemistry has another important research direction focusing on the development of artificial proteins/enzymes having the potential for future practical applications. The functional and structural modelling of metallohydrolases with hydrolytic activity and type 2 and 3 copper-containing enzymes participating in the catalysis of the oxidation of various organic molecules attracted special attention in recent years. A number of model compounds of metallohydrolases or copper-containing oxidases are known from the literature. These compounds are, almost without exception, metal complexes of synthetic ligands. For the last few years, metal ion–peptide systems have not been studied at all from this point of view, because amide-coordinated species were predominant in the physiological pH range in almost all previously studied copper(II)–peptide system. Hereby, the structural and functional analogy between the proteins to be modelled and the investigated peptides have been eliminated. The coordination of amide nitrogens significantly reduces the Lewis-acid character of the metal ion and stabilizes the +2 oxidation state of copper leading to the dramatic decrease of catalytic activity in both types of reactions. On the other hand research on metal complexes of histidine-containing peptides pointed out that the coordination mode of the ligand depends considerably on the number and position of the histidine subunits in the peptide sequence and the quality of the surrounding donor groups. In our research group we managed to prevent the coordination of amide nitrogen around neutral pH with a suitably chosen peptide sequence and created accurate functional and structural enzyme models.

In the fourth chapter of the thesis we follow the recent strategy and report the coordination chemical behavior of a novel type ligand in the presence of zinc(II) and copper(II) ions. Based on our previous experiences, we designed and prepared the **(His)<sub>4</sub>-(Lys)<sub>2</sub>-Lys-CONH<sub>2</sub>** dendrimer type heptapeptide – consisting of three lysines and four histidines. Two lysines have been coupled to the  $\alpha$  and  $\epsilon$  amino groups of the C-terminal. Four histidines have been coupled to the 2-2 different amino groups of the second generation lysines. The branches of the dendrimer peptide are more flexible than peptides with straight chain, thus the density of the metal binding site might be higher. The ligand possesses eight primary nitrogen donors,

thus this compound may form a binuclear metal complex that behaves as an efficient nuclease and/or oxidase enzyme model.

We examined the protonation equilibria, and the complex formation processes with copper(II) and zinc(II) ions in M:L = 1:1 and 2:1 initial concentration ratio in aqueous solutions. The composition, speciation and the solution structure of the complexes have been determined by combined pH-potentiometric titrations, visible absorption, circular dichroism and NMR spectroscopy. Mono- and bimetallic complexes of both metal ions were formed with bis-histamine type coordination as the main species. While above pH 8 the precipitation of a neutral complex was observed for both metal ions, in the copper(II) containing systems it dissolved in alkaline solutions (pH > 11.0). The resulting complex in equimolar system displays deprotonated amide-nitrogen coordination, with fused five-membered chelate rings around the metal ion in  $[\text{CuH}_3\text{L}]^-$ . At the same time, only one copper(II) is able to coordinate in the same manner in the  $[\text{Cu}_2\text{H}_5\text{L}]^-$  species. The second metal ion is probably surrounded by two amide nitrogens and two others either from amino or imidazole donor groups. The mononuclear  $[\text{CuL}]^{2+}$  and the binuclear  $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$  complexes showed low activity in oxidation of 3,5-ditertbutyl-catechol. The hydrolytic assays show somewhat more promising picture. Based on our experiment we may state, that the  $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$  species is moderately effective at pH = 7.1, but we cannot be confident whether in oxidative or hydrolytic manner. The same experiments have been performed with the resin-linked ligand in the presence of metal ions. The gel electrophoresis demonstrated a significant effect of the zinc(II)-containing system, where after 18 hours all of the superhelical DNA turned into open circular form.

## 9. Irodalom

- [1] H. Kozłowski, W. Bal, M. Dyba, T. Kowalik-Jankowska, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, 184, 319
- [2] H. Kozłowski, T. Kowalik-Jankowska, M. Jezowska-Bojczuk, *Coord. Chem. Rev.*, 2005, 249, 2323
- [3] I. Sóvágó, K. Ósz, *Dalton Trans.*, 2006, 3841
- [4] I. Sóvágó, 'Metal complexes of peptides and their derivatives', in K. Burger (Ed.), *Biocoordination Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, 1990
- [5] C. Kállay, Z. Nagy, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, I. Sóvágó, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2007, Article ID 30394, doi:10.1155/2007/30394.
- [6] T. Kowalik-Jankowska, M. Ruta-Dolejsz, K. Wiśniewska, L. Łankiewicz, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, 92, 1
- [7] T. Kowalik-Jankowska, M. Ruta, K. Wiśniewska, L. Łankiewicz, *J. Inorg. Biochem.*, 2003, 95, 270
- [8] M. Mylonas, J. Plakatouras, N. Hadjiliadis, A. Krezel, W. Bal, *Inorg. Chim. Acta*, 2002, 339, 60
- [9] J. Ueda, N. Ikota, A. Hanaki, K. Koga, *Inorg. Chim. Acta*, 1987, 135, 43
- [10] M. Casoralo, M. Chelli, M. Ginanneschi, F. Laschi, M. Muniz-Miranda, A.M. Papini, G. Sbrana, *Spectrochim. Acta*, 1999, 55A, 1675
- [11] B. Bóka, A. Myari, I. Sóvágó, N. Hadjiliadis, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, 98, 113
- [12] M. Casoralo, M. Chelli, M. Ginanneschi, F. Laschi, L. Messori, M. Muniz-Miranda, A. M. Papini, T. Kowalik-Jankowska, H. Kozłowski, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, 89, 181
- [13] D. Sanna, G. Micera, Cs. Kállay, V. Rigó, I. Sóvágó, *Dalton Trans.*, 2004, 2702
- [14] Cs. Kállay, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, *Inorg. Chim. Acta*, 2009, 362, 935
- [15] S. Rajkovic, Cs. Kállay, R. Serényi, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, *Dalton Trans.*, 2008, 5059
- [16] K. Ósz, Z. Nagy, G. Pappalardo, G. Di Natale, D. Sanna, G. Micera, E. Rizzarelli, I. Sóvágó, *Chem. Eur. J.*, 2007, 13, 7129
- [17] G. Di Natale, C. A. Damante, Z. Nagy, K. Ósz, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, I. Sóvágó, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, 102, 2012
- [18] A. Jancsó, Z. Paksi, N. Jakab, B. Gyurcsik, A. Rockenbauer, T. Gajda, *Dalton Trans.*, 2005, 3187
- [19] I.N. Jakab, A. Jancsó, T. Gajda, B. Gyurcsik, A. Rockenbauer, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, 102, 1438
- [20] M. Luczkowski, K. Wisniewska, L. Lankiewicz, H. Kozłowski, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2002, 2266
- [21] D. Valensin, F. M. Mancini, M. Luczkowski, A. Janicka, K. Wisniewska, E. Gaggelli, G. Valensin, L. Lankiewicz, H. Kozłowski, *Dalton Trans.*, 2004, 16
- [22] Cs. Kállay, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, *Dalton Trans.*, 2006, 4545
- [23] I. N. Jakab, O. Lőrincz, A. Jancsó, T. Gajda, B. Gyurcsik, *Dalton Transactions*, 2008, 48, 6987
- [24] T. Kowalik-Jankowska, L. Biega, M. Kuczer, D. Konopinska, *J. Inorg. Biochem.*, 2009, 103, 135
- [25] Z. Paksi, A. Jancsó, F. Pacello, N. Nagy, A. Battistoni, T. Gajda, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, 102, 1700
- [26] R. Vogler, H. Vahrenkamp, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2002, 761

- [27] A. Myari, G. Malandrinos, J. Plakatouras, N. Hadjiliadis, I. Sóvágó, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2003, 1, 99
- [28] C. Kállay, K. Ósz, A. Dávid, Z. Valastyán, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, I. Sóvágó, *Dalton Trans.*, 2007, 4040
- [29] L. Szyrwił, E. Jankowska, A. Janicka-Kłos, Z. Szewczuk, D. Valensin and H. Kozłowski, *Dalton Trans.*, 2008, 6117
- [30] G. Brookes, L.D. Pettit, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1975, 2112
- [31] H. Sigel, R.B. Martin, *Chem. Rev.*, 1982, 82, 385
- [32] E. Farkas, I. Sóvágó, A. Gergely, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1983, 1545
- [33] P.J. Morris, R.B. Martin, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1971, 33, 2913
- [34] M.A. Zoroddu, T. Kowalik-Jankowska, H. Kozłowski, K. Salnikow, M. Costa, *J. Inorg. Biochem.*, 2001, 85, 47
- [35] M.A. Zoroddu, M. Peana, T. Kowalik-Jankowska, H. Kozłowski, M. Costa, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, 98, 931
- [36] K. Kulon, D. Wozniak, K. Wegner, Z. Grzonka, H. Kozłowski, *J. Inorg Biochem.*, 2007, 101, 1699
- [37] K. Kulon, D. Valensin, W. Kamysz, G. Valensin, P. Nadolski, E. Porciatti, E. Gaggelli, H. Kozłowski, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, 102, 960
- [38] P. Niederhafner, J. Šebestík, J. Ježek, *J. Pept. Sci.*, 2005, 11, 757
- [39] J.P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, 5409
- [40] I. Petrushina, A. Ghochikyan, M. Mktrichyan, G. Mamikonyan, N. Movsesyan, H. Davtyan, A. Patel, E. Head, D.H. Cribbs, M.G. Agadjanyan, *J. Neurosci.*, 2007, 27, 12721
- [41] R. El Ridi, M. Montash, H. Tallima, *Scand. J. Immunol.*, 2004, 60, 392
- [42] S. Misumi, R. Nakajima, N. Takamune, S. Shoji, *J. Virol.*, 2001, 75, 11614
- [43] G. Mező, B. Dalmádi, I. Mucsi, S. Bősze, E. Rajnavölgyi, F. Hudecz, *J. Pept. Sci.*, 2002, 8, 107
- [44] a) Ch-P. Pau, W. Luo, J.S. McDougal, *J. Immunol. Meth.*, 2007, 318, 59–64; b) C.B. Ndongmo, W.M. Switzer, Ch-P. Pau, C. Zeh, A. Schaefer, D. Pieniazek, T.M. Folks, M.L. Kalish, *J. Clin. Microbiol.*, 2004, 42, 5161
- [45] Y. Akbarali, J. Matousek-Ronck, L. Hunt, L. Staudt, M. Reichlin, J.M. Guthridge, J.A. James, *J. Autoimmun.*, 2006, 27, 272
- [46] a) F. Hudecz, *Biologicals*, 2001, 29, 197–207; b) K. Udvarnoki, L. Cervenak, K. Uray, F. Hudecz, I. Kacs Kovics, R. Spallek, M. Singh, G. Füst, Z. Prohászka, *Clin. Vaccine Immunol.*, 2007, 14, 335
- [47] A. Pini, C. Falciani, L. Bracci, *Curr. Prot. Pept. Sci.*, 2008, 9, 468
- [48] R. Szabó, G. Mező, E. Pállinger, P. Kovács, L. Köhida, S. Bősze, F. Hudecz, *Bioconjug. Chem.*, 2008, 19, 1078
- [49] D. Sun, V. Jones, E.I. Carson, R.E.B. Lee, M.S. Scherman, M.R. McNeil, R.E. Lee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, 17, 6899
- [50] K.W. Wegmann, C.R. Wagner, R.H. Whitham, D.J. Hinrichs, *J. Immunol.*, 2008, 181, 3301
- [51] M.J. Ciesielski, A.L. Kazim, R.F. Barth, R.A. Fenstermaker, *Cancer Immunol. Immunother.*, 2005, 54, 107
- [52] J. Ziegler, R.T. Chang, D.W. Wright, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 2395
- [53] J. Zhu, P.W. Luther, Q. Leng, A.J. Mixson, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, 50, 2797
- [54] Q. Leng, A.J. Mixson, *Nucl. Acids Res.*, 2005, 33, e40; Q. Leng, P. Scaria, O.B. Ioffe, M. Woodle, A.J. Mixson, *J. Gene Med.*, 2006, 8, 1407; Q. Leng, L. Goldgeier, J. Zhu, P. Cambell, N. Ambulos, A.J. Mixson, *Drug News Perspect.*, 2007, 20, 77

- [55] J. Reményi, G. Csík, P. Kovács, F. Reig, F. Hudecz, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, 1758, 280; K.B. Bai, O. Láng, E. Orbán, R. Szabó, L. Kőhidai, F. Hudecz, G. Mező, *Bioconjug. Chem.*, 2008 [Epub ahead of print].
- [56] L. Bracci, C. Falciani, B. Lelli, L. Lozzi, Y. Runci, A. Pini, M.G. De Montis, A. Tagliamonte, P. Neri, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 46590
- [57] I. Matic, M. van Hagen, J. Schimmel, B. Macek, S.C. Ogg, M.H. Tatham, R.T. Hay, A.I. Lamond, M. Mann, A.C.O. Vertegaal, *Mol. Cell. Proteomics*, 2008, 7, 132
- [58] S. Singhal, M.C. Taylor, R.T. Baker, *BMC Biochem.*, 2008, 9(Suppl 1):S3
- [59] H. Ton-That, K.F. Faull, O. Schneewind, *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 22285
- [60] R. Fairman, K.S. Åkerfeldt, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2005, 15, 453
- [61] H. Satofuka, S. Amano, T. Fukui, H. Atomi, M. Takagi, T. Imanaka, *Biotechnol. Lett.*, 2000, 22, 1423
- [62] G.T. Dolphin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 7287
- [63] A.K. Galande, S.A. Hilderbrand, R. Weissleder, Ch-H. Tung, *J. Med. Chem.*, 2006, 49, 4715
- [64] C. Montigny, C. Jaxel, A. Shainskaya, J. Vinh, V. Labas, J.V. Møller, S.J.D. Karlsh, M le Maire, *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 43971
- [65] Y. Feng, Sh. Cao, A. Xiao, W. Xie, Y. Li, Y. Zhao, *Peptides*, 2006, 27, 1554
- [66] A.J. Scotter, M. Guo, M.M. Tomczak, M.E. Daley, R.L. Campbell, R.J. Oko, D.A. Bateman, A. Chakrabarty, B.D. Sykes, P.L. Davies, *BMC Struct. Biol.*, 2007, 7:63.
- [67] B. Jendrusch-Borkowski, J. Awad, F. Wasgestian, *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.*, 1999, 35, 355
- [68] P.-L. Kuo, W.-J. Liang, F.-Y. Wang, *J. Polym. Sci.*, 2003, 41A, 1360
- [69] R. Bonomi, F. Selvestre, V. Lombardo, C. Sissi, S. Polizzi, F. Mancin, U. Tonellato, P. Scrimin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 15744
- [70] A.L. Jones, M.D. Hulett, C.R. Parish., *Immunol. Cell Biol.*, 2005, 83, 106
- [71] T. Koide, D. Foster, S. Yoshitake, E. W. Davie, *Biochemistry*, 1986, 25, 2220
- [72] H. Haupt, N. Heimburger, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1972, 353, 1125
- [73] T. Koide, S. Odani, T. Ono, *J. Biochem.*, 1985, 98, 1191
- [74] D-B. Borza, F. M. Tatum, W. T. Morgan, *Biochemistry*, 1996, 35, 1925
- [75] F. Doñate, J. C. Juarez, X. J. Guan, N. V. Shipulina, M. L. Plunkett, Z. Tel-Tsur, D. E. Shaw, W. T. Morgan, A. P. Mazar, *Cancer Res.*, 2004, 64, 5812.
- [76] A.L. Jones, M.D. Hulett, J.G. Altin, G. Hogg, C.R. Parish, *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 38267
- [77] L. L. K. Leung, *J. Clin. Invest*, 1986, 77, 1305
- [78] N. N. Gorgani, C. R. Parish, J. G. Altin, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 29633
- [79] L. L. K. Leung, *J. Clin. Invest*, 1984, 73, 5
- [80] W. T. Morgan, *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, 535, 319
- [81] M. K. Burch, W. T. Morgan, *Biochemistry*, 1985, 24, 5919
- [82] A.L. Jones, M.D. Hulett, C.R. Parish, *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 30114
- [83] D.-B. Borza, W.T. Morgan, *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 5493
- [84] W. T. Morgan, *Biochemistry*, 1985, 24, 1496
- [85] S. L. Guthans, W. T. Morgan, *Arch. Biochim. Biophys*, 1982, 218, 320
- [86] X. Guan, J. C. Juarez, X. Qi, N. V. Shipulina, D. E. Shaw, W. T. Morgan, K. R. McCrae, A. P. Mazar, F. Doñate, *Thromb. Haemost.* 2004, 92, 403
- [87] D.-B. Borza, W. T. Morgan, *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 5718
- [88] N. Tsuchida-Straeten, S. Ensslen, C. Schäfer, M. Wöltje, B. Denecke, M. Moser, S. Gräber, S. Wakabayashi, T. Koide, W. Jahnen-Dechent, *J. Thromb. Haemost.*, 2005, 3, 865



- [89] J. C. Juarez, X. Guan, N.V. Shipulina, M.L. Plunkett, G.C. Parry, D.E. Shaw, J.-C. Zhang, S.A. Rabbani, K.R. McCrae, A.P. Mazar, W.T. Morgan, F. Donate, *Cancer Res.*, 2002, 62, 5344
- [90] A.-K. Olsson, H. Larsson, J. Dixelius, I. Johansson, C. Lee, C. Oellig, I. Bjork, L. Claesson-Welsh, *Cancer Res.*, 2004, 64, 599
- [91] M. Vanwildemeersch, A.-K. Olsson, E. Gottfridsson, L. Claesson-Welsh, U. Lindahl, D. Spillmann, *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, 10298
- [92] J. Dixelius, A.-K. Olsson, Å. Thulin, C. Lee, I. Johansson, L. Claesson-Welsh, *Cancer Res.*, 2006, 66, 2089
- [93] C. Lee, J. Dixelius, Å. Thulin, H. Kawamura, L. Claesson-Welsh, A.-K. Olsson, *Exp. Cell Res.*, 2006, 312, 2547
- [94] R. Simantov, M. Febbraio, R. Crombie, A. S. Asch, R. L. Nachman, R. L. Silverstein, *J. Clin. Invest.*, 2001, 107, 45
- [95] V. Rydengård, A.-K. Olsson, M. Mörgelin, A. Schmidtchen, *FEBS J.*, 2007, 274, 377
- [96] V. Rydengård, O. Shannon, K. Lundqvist, L. Kacprzyk, A. Chalupka, A.-K. Olsson, M. Mörgelin, W. Jahnen-Dechent, M. Malmsten, A. Schmidtchen, *Plos Pathogens*, 2008, 8, e1000116. doi:10.1371/journal.ppat.1000116
- [97] G. Multhaup, A.I. Bush, P. Pollwein, C.L. Masters, K. Beyreuther, *J. Protein Chem.*, 1992, 11, 398
- [98] S. Moria, H.K. Takahashia, K. Yamaokab, M. Okamoto, M. Nishibori, *Life Sciences*, 2003, 73, 93
- [99] B. B. Muhoberac, M. K. Burch, W. T. Morgan, *Biochemistry*, 1988, 27, 746
- [100] T. W. Hutchens, R. W. Nelson, T.-T. Yip, *J. Mol. Recog.*, 1991, 4, 151
- [101] M. S. O'Reilly, T. Boehm, Y. Shing, N. Fukai, G. Vasios, W.S. Lane, E. Flynn, J.R. Birkhead, B.R. Olsen, J. Folkman, *Cell*, 1977, 88, 277
- [102] J. Folkman, *Exp. Cell Res.*, 2006, 312, 594-607
- [103] A. Abdollahi, P. Hahnfeldt, C. Maercker, H.J. Grone, J. Debus, W. Ansorge, J. Folkman, L. Hlatky, P.E. Huber, *Mol. Cell*, 2004, 13, 649
- [104] Besenyi T., Pákozdi A., Végvári A., Szabó Z., Szekanecz Z., *Magy Immunol/Hun Immunol* 2008, 7(1–2), 4
- [105] M. Dhanabal, R. Ramchandran, R. Volk, I. E. Stillman, M. Lombardo, M. L. Iruela-Arispe, M. Simons, V. P. Sukhatme, *Canc Res.*, 1999, 59, 189
- [106] S. S. Yoon, H. Eto, Ch. Lin, H. Nakamura, T. M. Pawlik, S. U. Song, K. K. Tanabe, *Canc. Res.*, 1999, 59, 6251
- [107] A.-K. Olsson, I. Johansson, H. Åkerud, B. Einarsson, R. Christofferson, T. Sasaki, R. Timpl, L. Claesson-Welsh, *Cancer Res.*, 2004, 64, 9012
- [108] L. Taddei, P. Chiarugi, L. Brogelli, P. Cirri, L. Magnelli, G. Raugei, M. Ziche, H. J. Granger, V. Chiarugi, G. Ramponi, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1999, 263, 340
- [109] B. Kim Lee Sim, N. J. MacDonald, E. R. Gubish, *Cancer Metast. Rev.*, 2000, 19, 181
- [110] Y.H. Ding, K. Javaherian, K.M. Lo, R. Chopra, T. Boehm, J. Lianciotti, B. A. Harris, Y. Li, R. Shapiro, E. Hohenester, R. Timpl, J. Folkman, D.C. Wiley, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, 95, 10443
- [111] T. Boehm, M.S. O'Reilly, K. Keough, J. Shiloach, R. Shapiro, J. Folkman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, 252, 190
- [112] R.M. Tjin Tham Sjin, R. Satchi-Fainaro, A. E. Birsner, V.M.S. Ramanujam, J. Folkman, K. Javaherian, *Cancer Res.*, 2005, 65, 3656
- [113] R. Sankararamakrishnan, S. Verma, S. Kumar, *Proteins*, 2005 Jan 1;58 (1):211-21 15508143 (P,S,E,B)
- [114] S. A. Lowndes, A. L. Harris, *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2005, 10, 299

- [115] M. H. Kulke, E. K. Bergsland, D. P. Ryan, P. C. Enzinger, T. J. Lynch, A. X. Zhu, J. A. Meyerhardt, J. V. Heymach, W. E. Fogler, C. Sidor, A. Michelini, K. Kinsella, A. P. Venook, C. S. Fuchs, *J. Clin. Oncology*, 2006, 24, 22
- [116] H.-D. Youn, E.-J. Kim, J.-H. Roe, Y. C. Hah, S.-O. Kang, *Biochem J.*, 1996, 318, 889
- [117] T. Eitinger, *J. Bacteriology*, 2004, 186, 22, 7821
- [118] J. Wuerges, J.-W. Lee, Y.-I. Yim, H.-S. Yim, S.-O. Kang, K.D. Carugo, *Biochemistry*, 2004, 101, 8569
- [119] D. P. Barondeau, C. J. Kassmann, C. K. Bruns, J. A. Tainer, E. D. Getzoff, *Biochemistry*, 2004, 43, 8038
- [120] M. Schmidt, S. Zahn, M. Carella, Oliver Ohlenschläger, M. Görlach, E. Kothe, J. Weston, *ChemBioChem* 2008, 9, 2135
- [121] J. Shearer, N. Zhao, *Inorg. Chem.* 2006, 45, 9637
- [122] J. Shearer, A. Dehestani, F. Abanda, *Inorg. Chem.*, 2008, 47, 2649
- [123] J. Shearer, L. Long, *Inorg. Chem.*, 2006, 45, 2358
- [124] K. P. Neupane, J. Shearer, *Inorg. Chem.*, 2006, 45, 10552
- [125] K. P. Neupane, K. Gearty, A. Francis, J. Shearer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 14605
- [126] V. Pelmeshnikov, P. E. M. Siegbahn, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 7466
- [127] D. Tietze, H. Breitzke, D. Imhof, E. Kothe, J. Weston, G. Buntkowsky, *Chem. Eur. J.*, 2008, 15, 517
- [128] F.J.C. Rosotti, H. Rosotti, *The determination of stability constants*, McGraw-Hill Book Co., New York, 1962, p. 149.
- [129] E. Högfeltdt, *Stability Constants of Metal-Ion Complexes, Part A. Inorganic Ligands*, Pergamon, New York, 1982, p. 32.
- [130] L. Zékány, I. Nagypál, G. Peintler, *PSEQUAD for chemical equilibria*, Technical Software Distributors: Baltimore, MD, 1991.
- [131] H. M. Irving, M.G. Miles, L.D. Pettit, *Anal. Chim. Acta*, 1967, 38, 475
- [132] R. Hernandez-Molina, A. Mederos, P. Gili, S. Domínguez, F. Lloret, J. Cano, M. Julve, C. Ruiz-Pérez, X. Solans, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1997, 4327
- [133] A.E. Martell, R.M. Smith (Eds.), *Critical Stability Constants*, Plenum Press, 3 (1975)
- [134] E.J. Billo, *Inorg. Nucl. Chem. Lett*, 1974, 10, 613
- [135] H. Sigel, R.B. Martin, *Chem. Rev.*, 1982, 82, 385
- [136] L.D. Pettit, J.E. Gregor, H. Kozlowski, in: R.W. Hay, J.R. Dilworth, K.B. Nolan (Eds.), *Perspectives on Bioinorganic Chemistry*, vol. 1, JAI Press, London, 1991, 1-41
- [137] E. Prenesti, P.G. Daniele, M. Prencipe, Ostacoli, G., *Polyhedron*, 1999, 18, 3233
- [138] E. Prenesti, P.G. Daniele, S. Berto, S. Toso, *Polyhedron*, 2006, 25, 2815
- [139] T. Szabó-Plánka, A. Rockenbauer, L. Korecz, *Magn. Reson. Chem.*, 1999, 37, 484
- [140] J.M. McCord, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 6049
- [141] I. Fridovich, *Annu. Rev. Biochem.*, 1995, 64, 97
- [142] D.D. Perrin, Boyd Dempsey (Eds.), *Buffers for pH and Metal Ion Control*, Chapman and Hall Ltd., London, 1974, p 92.
- [143] P. Gockel, M. Gelinsky, R. Vogler, H. Vahrenkamp, *Inorg. Chim. Acta*, 1998, 272, 115
- [144] J. Šebek, B. Gyurcsik, J. Šebestík, Z. Kejík, L. Bednárová, Petr Bouř, *J. Phys. Chem. A*, 2007, 111, 2750
- [145] Z. Shi, C. Anders Olson, G.D. Rose, R.L. Baldwin, N.R. Kallenbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 9190
- [146] E.W. Ronish, S. Krimm, *Biopolymers*, 1974, 13, 1635
- [147] S. Kakinoki, Y. Hirano, M. Oka, *Polym. Bull.*, 2005, 53, 109
- [148] D. Sanna, G. Micera, Cs. Kállay, V. Rigó, I. Sóvago, *Dalton Trans.*, 2004, 2702

- [149] I.N. Jakab, B. Gyurcsik, T. Körtvélyesi, I. Vosekalna, J. Jensen and E. Larsen, J. Inorg. Biochem., 2007, 101, 1376
- [150] P. Stanczak, M. Luczkowski, P. Juszczak, Z. Grzonka, H. Kozłowski, Dalton Trans., 2004, 2102
- [151] E. I. Török, T. Gajda, B. Gyurcsik, G.K. Tóth, A. Péter, J. Chem. Soc. Dalton Trans., 1998, 1205
- [152] S.A. Daignault, A.P. Arnold, A.A. Isab, D.L. Rabenstein, Inorg. Chem., 1985, 24, 3984
- [153] D.L. Rabenstein, S.A. Daignault, A.A. Isab, A.P. Arnold, M.M. Shoukry, J. Am. Chem. Soc., 1985, 107, 6435
- [154] M. Mylonas, A. Krzel, J.C. Plakatouras, N. Hadjiliadis, W. Bal, Bioinorg. Chem. Appl. 2004, 2, 125
- [155] C. Harford, B. Sarkar, Acc. Chem. Res., 1997, 30, 123
- [156] T. Gajda, B. Henry, A. Aubry, J.-J. Delpuech, Inorg. Chem., 1996, 35, 586
- [157] W. Bal, M. Jezowska-Bojczuk, K.S. Kasprzak, Chem. Res. Toxicol., 1997, 10, 906
- [158] C. Conato, H. Kozłowski, P. Mlynarz, F. Pulidori, M. Remelli, Polyhedron, 2002, 21, 1469
- [159] E. Farkas, I. Sovago, T. Kiss, A. Gergely, J. Chem. Soc., Dalton Trans., 1984, 611
- [160] M. Rozga, M. Sokołowska, A.M. Protas, W. Bal, J. Biol. Inorg. Chem., 2007, 12, 913
- [161] H. Kozłowski, B. Decock-le Révérend, D. Ficheux, C. Loucheux, I. Sovago, J. Inorg. Biochem., 1987, 29, 187
- [162] W. Bal, H. Kozłowski, R. Robbins, L.D. Pettit, Inorg. Chim. Acta, 1995, 231, 7
- [163] A. T. Fiedler, P. A. Bryngelson, M. J. Maroney, T. C. Brunold, J. Am. Chem. Soc., 2005, 127, 5449
- [164] Ø. Hatlevik, M.C. Blanksma, V. Mathrubootham, A.M. Arif, E. Hegg, J. Biol. Inorg. Chem., 2004, 9, 238
- [165] K. Varnagy, H. Kozłowski, I. Sovago, T. Kowalik-Jankowska, M. Kruszynski, J. Zboinska, J. Inorg. Biochem., 1988, 34, 83
- [166] F. Osterloh, W. Saak, S. Pohl, J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 5648
- [167] M. Vašák, J.H.R. Kägi, B. Holmquist, B.L. Vallee, Biochemistry, 1981, 20, 6659
- [168] A. Yokoyama, H. Aiba, H. Tanaka, Bull. Chem. Soc. Japan, 1974, 47, 112
- [169] M. T. Beck, I. Nagypál, 'Chemistry of Complex Equilibria', Akadémiai Kiadó, 1990
- [170] J. Springborg, Dalton Trans., 2003, 1653
- [171] S. Bruni, F. Cariati, P. G. Daniele, E. Prenesti, Spectrochim. Acta, 2000, 56, 815
- [172] B. Gyurcsik, I. Vosekalna, E. Larsen, Acta Chem. Scand., 1997, 51, 49
- [173] B. Gyurcsik, I. Vosekalna, E. Larsen, J. Inorg. Biochem., 2001, 85, 89

## 10. A szerző közleményeinek listája

### Az értekezés anyagához kapcsolódó közlemények:

1. A. Jancsó, **A. Kolozsi**, B. Gyurcsik, N.V. Nagy, T. Gajda  
Probing the Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> binding affinity of histidine-rich glycoprotein  
*Journal of Inorganic Biochemistry* (nyomtatásban)  
2009 doi: 10.1016/j.jinorgbio.2009.09.002 IF<sub>2008</sub>: 3,133
2. **A. Kolozsi**, A. Jancsó, N.V. Nagy, T. Gajda  
N-terminal of anti-angiogenic endostatin binds copper(II) with very high affinity  
*Journal of Inorganic Biochemistry*, 2009, 103, 940 IF<sub>2008</sub>: 3,133
3. **A. Kolozsi**, I. Vosekalna, T. Martinek, E. Larsen, B. Gyurcsik  
Copper(II) and zinc(II) ion binding properties of a MAP type branched ligand with  
histidines as surface functionalities  
*Dalton Transaction*, 2009, 5647 IF<sub>2008</sub>: 3,580

**A közlemények összesített hatástényezője (ΣIF): 9,846**

### Egyéb közlemény:

4. **A. Kolozsi**, A. Lakatos, G. Galbács, A.Ø. Madsen, E. Larsen, B. Gyurcsik  
A pH-Metric, UV, NMR, and X-ray Crystallographic Study on Arsenous Acid Reacting  
with Dithioerythritol  
*Inorganic Chemistry*, 2008, 47, 3832 IF<sub>2008</sub>: 4,147

## 11. Köszönetnyilvánítás

*Köszönetet mondok Kiss Tamás tanszékvezetőnek, amiért biztosította számomra annak lehetőségét, hogy a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken doktori munkámat elkészítsem, és amiért az eltelt évek alatt mindvégig biztatott és segített céljaim elérésében.*

*Köszönettel tartozom témavezetőimnek, **Gyurcsik Bélának** és **Gajda Tamásnak**, akik szakmailag támogattak, munkámat figyelemmel kísérték. Segítségük nélkül nem szerezhettem volna jártasságot a bioszervetlen kémia és a koordinációs kémia vizsgálati módszerei terén. Külön köszönet illeti Gyurcsik Bélát, akinek értékes szakmai tanácsai mellett emberi támogatására is bármikor számíthattam.*

*Köszönetemet fejezem ki Jancsó Attilának és Jakusch Tamásnak, akik sokat segítettek kísérleti eredményeim értelmezésében és kiértékelésében.*

*Köszönöm Erik Larsennek (The Royal Veterinary and Agricultural University (KVL), Koppenhága, Dánia) hogy laboratóriumában dolgozhattam, és erősítette bennem a mezőgazdaság iránti vonzalmat.*

*Hálás vagyok azoknak a munkatársaimnak, akik tanácsaikkal segítették munkámat és baráti légkört teremtettek. Külön köszönöm Szűcsné Tóth Katalinnak a laboratóriumban nyújtott segítségét, valamint a magyarság történelméről és ügyes-bajos dolgairól való beszélgetéseket.*

*Köszönetet szeretnék mondani minden barátomnak, akik az elmúlt években olykor túlzásba vitt melankóliámból kizökkenettek. Köszönöm Bede Ádám helyesírási tanácsait, javításait.*

*Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom szüleimnek, családomnak, akik mindvégig támogattak abban, hogy doktori tanulmányaimat sikeresen elvégezzem, és a nehéz időszakokat átvészéljem.*

